DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES DBP-GENS VON ADENOVIRUS TYP 2

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

JÜRGEN BLOCK

Bochum, Juni 1982

DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES DBP-GENS VON ADENOVIRUS TYP 2

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

JÜRGEN BLOCK

Bochum, Juni 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. W. Büttner
2. Referent: Prof. Dr. U. Winkler

Eingereicht am: 27. 6. 1982
Tag der mündlichen Prüfung: 18. 10. 1982

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie - Leiter: Prof. Dr. H. Werchau - in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Büttner in der Zeit von April 1979 bis Januar 1982 angefertigt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Büttner, der mir das Thema dieser Arbeit überließ und der am Gelingen des Ganzen durch alle nur erdenkliche Unterstützung in wissenschaftlichen, aber auch in persönlichen Fragen wesentlichen Anteil hat, danke ich hiermit auf das herzlichste.

Für die Möglichkeit, den Gerätepark des Lehrstuhls für Medizinische Mikrobiologie und Virologie zu benutzen, schulde ich Herrn Prof. Dr. H. Werchau Dank.

Frau Dr. S. Veres-Molnar danke ich für methodische Hinweise bei den Sequenzierungsreaktionen.

Für gute technische Assistenz habe ich Frau Jutta Koppe (MTA) und Frau Barbara Holtmann (MTA) zu danken.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. ABKÜRZUNGEN 1

B. EINLEITUNG 3

C. MATERIAL UND METHODEN 25

I. Zellen und Virus 25

1. Medium zur Zellzucht 25
2. Zellen 25
3. Virus 25

II. Analyse viraler DNA-Fragmente 25

1. DNA-Markermoleküle 25
1.1. Bacteriophage ØX 174 am 3 26
1.2. Plasmid pBR 322 26
2. Restriktionsendonukleasen 28
3. Restriktion viraler DNA-Fragmente mit Endonukleasen 28
3.1. Puffer und Lösungen für die Restriktionsansätze .. 29
3.2. Restriktion unmarkierter DNA-Fragmente 30
3.3. Restriktion 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente ... 31
3.4. Partialverdauung singulär 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente zur Kartierung nach Smith und Birnstiel 32
4. Analytische Gelelektrophoresen 33
4.1. Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch 34
4.2. Agarosegelelektrophorese 34
4.3. Polyacrylamidgelsysteme 36
4.3.1. Polyacrylamidgele in der HSI SE 520-Elektrophoreseeinheit 36
4.3.1.1. 4%-Polyacrylamidgele mit Hayward-Puffer 37
4.3.1.2. 5%- und 10%-Polyacrylamidgele mit Tris-Borat-Puffer 38
4.3.2. 5%-Kompaktgele mit Tris-Borat-Puffer 39

Seite

4.4. Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente 40
4.4.1. Ethidiumbromidfärbung von Polyacrylamidgelen 41
4.4.2. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen 41
4.4.3. Auswertung von analytischen Polyacrylamidgelen .. 42

III. Präparation von DNA-Fragmenten 46

1. Restriktion unmarkierter DNA-Fragmente für die präparative Agarose- oder Polyacrylamidgel-elektrophorese 46
2. Restriktion 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente für die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese 47
3. Reinigungsmethoden 48
3.1. Proteolyse 49
3.2. Phenolätherextraktion 49
3.3. Präparation 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente nach singulärer Restriktion vor der präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese 50
4. Präparative Gelelektrophoresen 51
4.1. Agarosegelelektrophorese 51
4.2. Polyacrylamidgelelektrophorese in der HSI SE 520-Elektrophoreseeinheit 51
5. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten 52
5.1. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen 52
5.2. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus präparativen Polyacrylamidgelen 53

IV. 5'-^{32}P-Endmarkierung doppelsträngiger DNA-Fragmente 55

1. Entfernung von 5'-Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase 55
2. Polynukleotidkinasereaktion 56

Seite

V. DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert 56

1. Reinigung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente über DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren 57
2. Limitierte, basenspezifische Spaltungen zur DNA--Sequenzierung ("Maxam- und Gilbert-Reaktion")..... 58
2.1. Experimentelle Vorbereitungen 59
2.2. Reagentien und Lösungen 59
2.2.1. Reagentien und Lösungen für alle Reaktionen 59
2.2.2. Reagentien und Lösungen für die einzelnen basenmodifizierenden Reaktionen 60
2.3. Arbeitsprozeduren für die 5 limitierten basenspezifischen Spaltungen 62
2.3.1. Arbeitsprozedur für die G-Reaktion 62
2.3.2. Arbeitsprozedur für die G+A-Reaktion 64
2.3.3. Arbeitsprozedur für die C+T-Reaktion 64
2.3.4. Arbeitsprozedur für die C-Reaktion 65
2.3.5. Arbeitsprozedur für die A > C-Reaktion 65
3. Sequenzgelelektrophoresen 65
3.1. Herstellung der Sequenzgele 66
3.2. Aufstellung und Präelektrophorese der Sequenzgele .. 68
3.3. Auflagerung der Proben 71
3.4. Autoradiographievorbereitungen nach der Elektrophorese 72
3.5. Sequenzgelautoradiographie 74
4. Sequenzdokumentation und Computerauswertung 75

D. ERGEBNISSE 78

I. Aufstellung von Restriktionsfragmentkarten des BglII J- und des EcoRI B/BglII C-Fragments der Ad2 DNA 78

1. Restriktionsanalyse des BglII J-Fragments mit verschiedenen Endonukleasen 79
2. Restriktionsfragmentkarte des BglII J/Fragments für die AluI- und HpaII-Subfragmente 83
3. Restriktionsanalyse des EcoRI B/BglII C-Fragments mit verschiedenen Endonukleasen 85

Seite

4. Restriktionsfragmentkarte des EcoRI B/BglII C-Fragments für die HaeIII-, HpaII- und einen Teil der AluI-Subfragmente 97

II. Sequenzierung des Ad2-DBP-Gens in seiner proteincodierenden Region 102

1. Sequenzierung des BglII J/AluI-2-Fragments und Festlegung des Poly(A)-Additionssignals für die DBP mRNA 103
2. Aufstellung der Sequenzierungsstrategie für das BglII J- und EcoRI B/BglII C-Fragment 106
3. Die Nukleotidsequenz des Ad2 DBP-Gens in seiner proteincodierenden Region 116

III. Sequenzanalyse 127

1. Der G+C-Gehalt, das Vorkommen des CpG-Nachbarpaares und die Häufigkeit von FnuDII- und HhaI--Erkennungssequenzen im Ad2 DBP-Gen 127
2. Die Erkennungssequenzen der weiteren Restriktionsendonukleasen des Typs II im Ad2 DBP-Gen 131
3. Der Leseraster für den Hauptkörper der Ad2 DBP mRNA 141
4. Der Codongebrauch im Ad2 DBP-Gen, die Aminosäurenzusammensetzung des Ad2 DBPs und sein entsprechendes Molekulargewicht 147
5. Die hypothetische Aminosäuresequenz des Ad2 DBPs ... 152

E. DISKUSSION 160

F. ZUSAMMENFASSUNG 176

G. LITERATUR 178

A. ABKÜRZUNGEN

A	- Adenin
Ad	- Adenovirus
Ad2	- Adenovirus Serotyp 2
APS	- Ammoniumperoxodisulfat
Bis	- N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	- Basenpaare
BSA	- Rinderserumalbumin
C	- Cytosin
CBP	- covalently bound protein
cpm	- Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
CT-DNA	- Kalbsthymus-DNA
DBP	- DNA-Bindungsprotein
DEAE-	- Diäthylaminoäthyl-
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- Äthylendiamintetraessigsäure
g	- Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	- Guanin
hpi	- Stunden nach der Infektion (hours post infection)
kb	- kiloBasen
kD	- kiloDaltons
l-Strang	- DNA-Strang, von dem mRNAs nach links transkribiert werden
mRNA	- Boten-Ribonukleinsäure
RNA	- Ribonukleinsäure
r-Strang	- DNA-Strang, von dem mRNAs nach rechts transkribiert werden
RT	- Raumtemperatur
S	- Svedberg-Einheit
SDS	- Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	- Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV40	- Simian Virus 40
T	- Thymin
T-Antigen	- großes Tumor-Antigen

TEMED	- N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	- Transfer-Ribonukleinsäure
ts	- temperatursensitiv
U	- Uracil
% v/v	- Volumenprozent
% w/w	- Gewichtsprozent

B. E I N L E I T U N G

Sobald ein animales Virus eine Zelle infiziert hat, läuft eine Reihe dynamischer Ereignisse ab, die von der Art des Virus-Wirtssystems abhängig sind. An einem Ende der Skala befindet sich die lytische oder produktive Infektion, die zur Biosynthese viralen Materials, zur Zerstörung und damit zum Tod der Zelle und zur Freisetzung reifer Virionen führt. Am anderen Skalenende liegt die abortive Infektion, in der bestimmte Schritte der Virusreplikation so stark gestört sind, daß die Bildung reifer Virionen unterbunden wird.

In allen Fällen jedoch hat das Virus die normale Zellkontrolle außer Kraft gesetzt, und die zellulären Mechanismen werden angewiesen, virale Gene zu exprimieren.

Um die hierbei wichtigen Prozesse, wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur, selektive Genexpression und Morphogenese des Virions zu gewährleisten, müssen viruscodierte Proteine mit viraler und zellulärer DNA eine Bindung eingehen.

Zu den DNA-haltigen Viren, die ihre Genome im Wirtszellkern replizieren, gehören die Adenoviridae. Bei der genetischen Analyse dieser Viren fanden sich Gene, die für Proteine codieren, die bei der DNA-Replikation erforderlich sind (Van der Vliet et al., 1977).

Andere virale DNA-Sequenzen vom linken Ende der Adenovirus--Genome, die bei einer inkompletten oder abortiven Infektion kultivierter tierischer Zellen mit Adenoviren in wenigen Fällen kovalent und dauerhaft in zelluläre DNA integriert werden und so zur Zelltransformation führen (Flint et al., 1976), codieren für Proteine, die die Induktion und Aufrechterhaltung der Transformation gewährleisten können (Graham et al., 1978).

Die Isolierung und Charakterisierung dieser Proteine und ihrer entsprechenden mRNA-Spezies als auch die Bestimmung, Kartierung und Struktur ihrer Genloci sind wichtige Schritte, die Rolle viraler Genprodukte bei der Transformation aufzuklären und die Mechanismen zu verstehen, die bei der DNA--Replikation in eukaryotischen Systemen ablaufen.

Die natürlichen Wirte der ca. 80 bisher bekannten Adenoviren sind Menschen, Menschenaffen, Rinder, Hunde, Mäuse und Vögel (Pereira et al., 1963). Sie besitzen folgende allgemeine Charakteristika:

Ein icosahedrisches, nicht weiter umhülltes äußeres Kapsid mit einem Durchmesser von 65 - 80 nm umschließt einen inneren DNA-Proteinkomplex ("Core"). Das Kapsid setzt sich aus 252 Kapsomeren zusammen. Die Flächen und Kanten des Icosaheders werden von 240 Kapsomeren gebildet, die Hexons genannt werden, da sie jeweils 6 Nachbarn besitzen. Die Eckpunkte des Icosaheders sind von sog. Pentons besetzt: Sie haben jeweils 5 Nachbarn (Ginsberg et al., 1966). Pentons bestehen aus einem Basalkörper in der Kapsidmatrix und einer antennenartigen Struktur, der Fiber, die in einem terminalen Knopf endet (Pettersson et al., 1968; Pettersson und Höglund, 1969). Adenoviren lassen sich mit Äther und Trypsin nicht inaktivieren.

Die linearen doppelsträngigen DNA-Genome besitzen Molekulargewichte von 2o - 28 x 10^6 Daltons (Green et al., 1967).

Humane Adenoviren sind sehr intensiv untersucht worden, nachdem sie 1953 von Rowe et al. aus Adenoidgewebe und 1954 von Hilleman und Werner aus Militärrekruten mit akuten respiratorischen Erkrankungen isoliert worden waren. Enders et al. schlugen 1956 in Bezug auf ihr Vorkommen im lymphatischen System den Namen Adenovirus vor.

Humane Adenoviren können nach ihrer Antigenität klassifiziert werden. Typenspezifische Antigene lassen sich im Neutralisationstest auf dem Hexon oder im Hämagglutinationshemmtest auf der Fiber nachweisen. Hierauf beruht die Einteilung in definierte Serotypen. Es sind bisher 36 Serotypen beschrieben worden, von denen 31 genau klassifiziert wurden (Ad1 - Ad31).

Eine Untergruppierung wurde vorgenommen, nachdem Trentin et al. 1962 entdeckt hatten, daß Serotyp 12 in neugeborenen Hamstern bösartige Tumore verursachen konnte. Nach der Stärke dieses onkogenen Potentials und im Zusammenhang mit dem G+C-Gehalt der DNA, der intertypischen DNA-Homologie, der Tumo antigengruppe und der Hämagglutinationsgruppierung

werden die humanen Adenoviren in fünf Untergruppen klassifiziert (Freeman et al., 1967; Green,1970, 1971; Green et al., 1979a; Huebner et al., 1962; Pina und Green, 1965; Sekikawa et al., 1978; Van der Eb et al., 1977; Yano et al., 1977). Tabelle 1 führt die fünf Untergruppen auf:

Untergruppe	Serotypen	Onkogenität	DNA (% G+C)
A	12, 18, 31	hoch	47-49
B	3, 7, 11, 14, 16, 21	schwach	49-52
C	1, 2, 5, 6	keine	57-59
D	8, 9, 10, 13, 15, 17 19, 20, 22 - 30	keine	57-59
E	4	keine	hoch

Tabelle 1: Untergruppen humaner Adenoviren (verändert nach Green et al., 1979a).

Neben dem hochonkogenen Serotyp 12 ist insbesondere der Serotyp 2 (Ad2) proteinchemisch und molekularbiologisch intensiv untersucht worden. Ad2 läßt sich in etablierten humanen Zellinien (HeLa- oder KB-Zellen) kultivieren und ist verhältnismäßig leicht in hohen Titern und großen Mengen zu reinigen (Green und Wold, 1979).

Ad2 DNA hat ein Molekulargewicht von 23×10^6 Daltons (Green et al., 1967), was einer Länge von $3{,}5 \times 10^4$ Basenpaaren entspricht. Das Genom wird auf einer physikalischen Karte in 0 - 100 Karteneinheiten mit der Nullposition am 3'-Ende des r-Strangs geteilt. Ad2 DNA ist im Core des Virions mit drei Proteinen assoziiert, von denen zwei, V und VII, stark basischer Natur sind (Laver et al., 1968; Rekosh und Russell, 1977). Das dritte Protein mit einem Molekulargewicht von 55kD ist kovalent an die molekularen Enden der Ad2 DNA gebunden und wird deshalb als "covalently bound protein" (CBP) bezeichnet (Robinson et al., 1973; Robinson und Bellet, 1974).

Die molekularen Enden des Ad2 Genoms besitzen eine invertierte Repetition (Arrand et al., 1974; Wolfson und Dressler, 1972). Shinagawa und Padmanabhan (1979) haben die Nukleotidsequenz dieser invertierten terminalen Repetition ermittelt: Sie ist 103 Nukleotide lang und in der Sequenz an beiden Termini exakt identisch.

Die lytische Infektion mit Ad2 verläuft in zwei zeitlichen Stadien der Genexpression, einer frühen Phase vor dem Beginn der DNA-Replikation und einer späten Phase, in der die virale DNA und danach die Strukturproteine synthetisiert werden.

Nachdem Adenovirionen die Wirtszellmembran penetriert haben, beginnt im Cytoplasma die Entfernung des Kapsids. Bei der Infektion permissiver Zellen mit Ad2 wird virale DNA 30 min. nach Inokulation in einer teilweise zerstörten Kapsidstruktur an der Kernmembran gefunden (Dales und Chardonnet, 1973; Lonberg-Holm und Philipson, 1969). Die Endstadien dieses "Uncoatings" finden nach dem Eindringen der viralen Nukleoproteinstruktur in den Zellkern statt. Wird die elterliche virale Nukleoproteinstruktur einer Nukleaseverdauung unterworfen, zeigt sich, daß sie sich langsam während der frühen Phase der Infektion in eine Struktur wandelt, die der zellulären Chromatins ähnlich ist (Sergeant et al., 1979; Tate und Philipson, 1979).

Während der frühen Phase werden ca. 30% des Ad2 Genoms in mRNA transkribiert (Philipson et al., 1974; Sharp et al., 1974). Die frühen mRNA Spezies sind isoliert worden (Büttner et al., 1974) und hybridisieren zu vier getrennten Regionen des Genoms, die mit E1 bis E4 bezeichnet werden (Büttner et al., 1976; Sharp et al., 1974). Ungefähr 10 Polypeptide, die von diesen Regionen codiert werden, sind durch <u>in vitro</u> Translationen von mRNAs, die wiederum durch Hybridisierung zu Restriktionsfragmenten der Ad2 DNA selektiert wurden, isoliert worden (Halbert et al., 1979; Harter und Lewis, 1978; Lewis et al., 1976).

Von den frühen Proteinen sind ein 14kD-, ein 19kD- und ein 72kD-Polypeptid gereinigt und charakterisiert worden. Das

14kD-Produkt ist ein basisches Protein, das im Cytoplasma der infizierten Zelle gefunden wird (Persson et al., 1978a). Das 19kD-Produkt ist ein Glykoprotein (Persson et al., 1980; Ross und Levine, 1979), das bei der Immunpräzipitation mit Transplantations-Antigen kopräzipitiert wird (Kvist et al., 1978).

Das 72kD-Protein ist das adenovirale DNA-Bindungsprotein (DBP), das weiter unten ausführlich beschrieben wird.

Eine heterogene Klasse von Polypeptiden, die als E 35kD - E 53 kD-Proteine bezeichnet werden, sowie 20kD-, 28kD-und 67kD--Polypeptide scheinen an der zellulären Transformation beteiligt zu sein, da die frühe Region E1, die für diese Polypeptide codiert (Lewis et al., 1976; Perricaudet et al., 1980a; Spector et al., 1980a; Smart et al., 1981; Wold und Green, 1979), in transformierten Zellen immer vorhanden ist (Eggerding und Raskas, 1978; Flint und Beltz, 1980; Lewis et al., 1980; Perricaudet et al., 1980b; Sambrook et al., 1974; Spector et al., 1980b).

Zwei zusätzliche frühe Gensequenzen sind in Ad5-infizierten Zellen bei den Positionen 11,2 - 14,5 und 19,8 - 23,5 auf dem 1-Strang des Genoms gefunden worden (Galos et al., 1979).

Nach der Expression der frühen Gene beginnt die Ad2 DNA sich semikonservativ nach einem Strang-Verdrängungsmechanismus zu replizieren. Die Replikation wird an beiden Termini des Moleküls initiiert (Winnacker, 1975; Weingärtner et al., 1976). Die invertierten terminalen Repetitionen sollen die intramolekulare Basenpaarung von bei der Replikation auftretenden DNA-Einzelsträngen erleichtern. Hierbei entsteht eine Struktur, die den Enden des Doppelstrangs ähnlich ist (Daniell, 1976).

Ein dem 55kD CBP strukturell eng verwandtes Protein ist höchstwahrscheinlich als Primer bei der Initiation der Ad2 DNA-Replikation erforderlich. Es soll nach kovalenter Bindung an ein Desoxycytidintriphosphat einen der parentalen DNA-Stränge vom 5'-Ende her verdrängen, die Kettenelongation des entstehenden Tochterstrangs wird dann durch zelluläre DNA Polymerasen katalysiert. Vom 3'-Ende des verdrängten

parentalen Strangs aus wird ebenfalls unter Beteiligung des Protein-Desoxycytidintriphosphat-Primers der zweite Tochterstrang synthetisiert.

Für diesen Initiationsmechanismus sprechen folgende Untersuchungsergebnisse:

Nach den Arbeiten von Challberg et al. (1980) und Challberg und Kelly (1981) ist der 5'-Terminus eines jeden bei der DNA-Replikation entstehenden Tochterstrangs kovalent an ein 80kD-Protein gebunden, das als Vorläufer der an die 5'-Termini reifer DNA gebundenen 55kD CBPs anzusehen ist. Nach partieller Proteolyse beider Proteine zeigt sich die Strukturverwandtschaft und beide Proteine sind über eine Phosphodiesterbindung zwischen einer β-OH-Gruppe eines Serinrests im Protein und der 5'-OH-Gruppe des terminalen Desoxycytidinrests der Ad2 DNA gebunden. Diese Ergebnisse werden durch weitere Befunde von Roninson und Padmanabhan (1980), Stillman (1981) und Stillman et al. (1981) gestützt.

Stillman et al. (1981) fanden ein 87kD großes präterminales Protein, dessen mRNA früh und spät in der Infektion nachgewiesen werden kann. Zusammen mit einem 105kD- und 75kD-Protein wird das 85kD-Protein von am l-Strang transkribierten mRNAs translatiert. Virionen der protease-defizienten temperatursensitiven Mutante H2ts1 enthalten nur das 87kD-Protein, wenn sie bei der nichtpermissiven Temperatur kultiviert werden. Virionen der Mutante H2ts1, die bei der permissiven Temperatur kultiviert worden waren, besitzen die 87kD- und 55kD-Form des CBP sowie zusätzlich ein 62kD-Intermediärprodukt.

Das aus Wildtypvirionen isolierte 55kD CBP (Rekosh et al., 1977) ist, wie Fingerprint-Analysen zeigten, nicht mit anderen frühen oder späten viralen Proteinen verwandt (Green et al., 1979b; Harter et al., 1979).

Das 80 - 87 kD-Protein stellt also das primäre Translationsprodukt des CBP-Gens dar und fungiert als Primer der DNA--Synthese. Die virusspezifische Protease überführt dann das 80 - 87kD-Protein über ein 62kD-Intermediärprodukt in das 55kD CBP bei der Reifung der Virionen.

Mit dem Beginn der Ad2 DNA-Replikation werden die späten Gene als großer Block vom r-Strang transkribiert (Positionen 30 - 100), die viralen Strukturproteine und ein 100kD-Protein, das zu den Nichtstrukturproteinen gerechnet wird, werden synthetisiert (Lewis et al., 1974; 1977). Gene für zwei zusätzliche Strukturproteine, IX und IVa_2, befinden sich auf dem l- und r-Strang zwischen den Positionen 9 - 16 (Pettersson et al., 1976).

Es ist nicht bekannt, ob eine Änderung in der Template für die Transkription oder ein Wechsel der RNA Polymerase an der Umschaltung von früher zu später Genexpression verantwortlich ist. Auf alle Fälle ist virale DNA-Synthese eine Voraussetzung für die Umschaltung, und Inhibitoren der DNA-Replikation, wie Cytosinarabinosid, blockieren die Genexpression in der späten Phase (Thomas und Mathews, 1980). Allerdings gilt dies nicht für das Strukturpolypeptid IX, das auch in Gegenwart von Inhibitoren der viralen DNA-Replikation synthetisiert wird (Persson et al., 1978b).

Auch der Terminus "Frühe Gene" bedeutet nicht, das frühe Proteine in der späten Phase nicht mehr synthetisiert werden. Gegenüber der Syntheserate der Strukturproteine ist diejenige der frühen Proteine in der späten Phase der Infektion wesentlich geringer.

Sowohl frühe als auch späte mRNAs sind Abkömmlinge großer nukleärer Transkripte und unterliegen einem Processing, in dem RNA-Sequenzen, die zu nichtzusammenhängenden Regionen der DNA korrespondieren, zu reifer mRNA zusammengefügt werden (Berget et al., 1977a; Chow et al., 1977). In diesem Prozeß, der als "Spleißen" bezeichnet wird, werden die RNA-Sequenzen des primären Transkripts, die in reifer mRNA nicht mehr auftreten sollen, die Introns, herausgespleißt und die verbleibenden proteincodierenden RNA-Sequenzen mit ihren sog. Führungssequenzen, die Exons, anschließend ligiert. Über die molekulare und enzymologische Basis dieses Ereignisses können zum jetzigen Zeitpunkt keine verläßlichen Aussagen gemacht werden.

Das frühe Transkriptionsmuster von Ad2 ist sehr kompliziert, da für jede Transkriptionseinheit zumindest ein Promotor gefunden wurde, und da auch RNA-Mosaikmoleküle bekannt sind, die nach Spleißvorgängen sowohl im nichtproteincodierenden als auch im proteincodierenden Teil der mRNA entstehen (Kitchingman et al., 1977; Berk und Sharp, 1978).

Der Promotor für den späten Genblock befindet sich bei der Position 16,3 links von den proteincodierenden Sequenzen und die Transkriptionseinheit dehnt sich fast bis zur Position 100 am rechten Ende des Genoms aus (Goldberg et al., 1978; Weber et al., 1977; Ziff und Evans, 1978). Die von diesem primären Transkript abgeleiteten mRNAs besitzen alle eine gemeinsame dreiteilige Führungssequenz, die aus Bereichen an den Positionen 16,4, 19,6, und 26,8 zusammengesetzt und an das 5'-Ende der unterschiedlichen codierenden Sequenzen gespleißt wird (Berget et al., 1977b; Chow et al., 1977; Dunn und Hassell, 1977; Klessig, 1977).

Zusätzlich besitzt die mRNA für das Fiber-Polypeptid eine vierte Führungssequenz, die zwischen die dreiteilige Führungssequenz und die proteincodierende Region gespleißt wird (Chow und Broker, 1978).

Elektronenmikroskopische Heteroduplexanalysen positionieren den proteincodierenden Teil für die mRNAs des 87kD präterminalen CBPs und die 105kD- und 75kD-Proteine von den DNA--Koordinaten 30, 26 und 23 bis 11,1, mit Führungssequenzen bei den Positionen 39, 68,5 und 75. Diese mRNAs und Region E2 mRNAs teilen sich die erste Führungssequenz und möglicherweise den gleichen Promotor (Stillman et al., 1981).

Alle virusspezifischen mRNAs, die im Cytoplasma als polysomale mRNAs vorliegen, tragen an ihrem 5'-Ende die terminale Kappenstruktur eines am Stickstoff 7 methylierten Guanosintriphosphats, m^7Gppp (Gelinas und Roberts, 1977; Hashimoto und Green, 1979; Hashimoto et al., 1981; Ziff und Evans, 1978), ebenso besitzen sie den für eukaryotische mRNA typischen 3'-terminalen Poly(A)-Schwanz von bis zu 200 Nukleotiden Länge (Philipson et al., 1971).

Zwei RNA mit niedrigem Molekulargewicht, VAI und VAII, werden auch vom Ad2 Genom transkribiert und sind sowohl früh als auch spät in der Infektion vorhanden (Söderlund et al., 1976). Ihre Position im Genom liegt bei den Koordinaten 29 - 30 (Mathews und Pettersson, 1978). Proteine, die von VA RNAs translatiert werden, sind nicht bekannt. Ein Licht auf ihre Funktion wirft die Hypothese von Mathews (1980), daß sie als Adaptormoleküle die aneinanderzuspleißenden mRNA-Sequenzen in einem Komplex zusammenführen.

Nachdem zahlreiche Ad2 DNA-Kopien im Zellkern der infizierten Zelle synthetisiert worden sind, und virale Strukturproteine aus dem Cytoplasma in den Kern transportiert wurden, läuft spät in der produktiven Infektion das Assembly der Virionen über Intermediärformen ab. Der Pool von Strukturproteinen und viraler DNA ist so groß, daß nicht alle viralen Makromoleküle zu reifen Virionen zusammengesetzt werden (Sundquist et al., 1973; Persson et al., 1979).

Über die hier knapp geschilderte Genomorganisation von Ad2 informiert die Abbildung 1.

Neu synthetisierte virale DNA in adenovirusinfizierten Zellen enthält weite Regionen von einzelsträngiger DNA (Pearson und Hanawalt, 1971; Pettersson, 1973; Raptis und Bourgaux, 1981; Sussenbach et al., 1976). Mehrere Arbeitsgruppen haben nach Proteinen gesucht, die an Einzelstrang-DNA binden. Über die DNA-Bindungsproteine (DBP) von Ad2 wird im folgenden berichtet.

Wenn Extrakte aus infizierten Zellen über Einzelstrang-DNA--Cellulosesäulen gegeben und Fraktionen durch Elution mit Puffern ansteigender Salzkonzentration aufgefangen werden, können zwei Proteine, die eine hohe Affinität zu Einzelstrang--DNA besitzen, aus Ad2-infizierten KB- oder HeLa-Zellen isoliert werden (Linné et al., 1977; Shanmugam et al., 1975). Die größere DNA-bindende Fraktion besteht aus einem Protein mit einem Molekulargewicht von 72kD nach Bestimmung in der SDS-PAGE. Die kleinere Fraktion enthält eine heterogene Gruppe

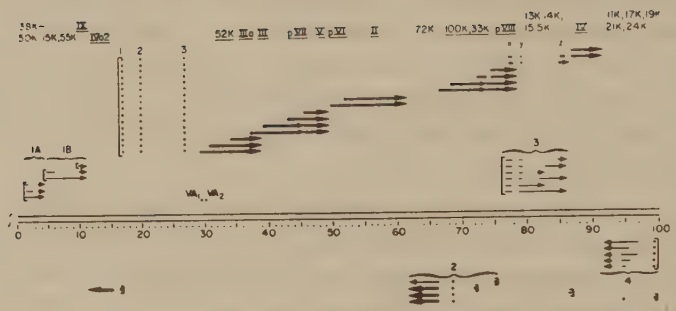


Abb. 1: Die Genomorganisation von Adenovirus Typ 2

Legende:

Frühe RNA ≙ dünne Pfeile
Späte RNA ≙ dicke Pfeile
Die Pfeile verlaufen in der 5'→3'-Richtung der Transkription. Im oberen Teil befinden sich die nach rechts, vom r-Strang transkribierten RNAs, im unteren Teil die nach links, vom l-Strang transkribierten RNAs. Die Lücken in den Pfeilen kennzeichnen die "herausgespleißten" Abschnitte (Introns) in den mRNAs. Für die frühen Regionen 2,3 und 4 sind nur die mRNA Hauptspecies angeführt. Die Intermediate des Processing für die späten mRNAs sind fortgelassen worden. Die von den aufgeführten mRNAs translatierten Proteine sind mit ihrem in der SDS-PAGE ermittelten Molekulargewicht (k = 1000 Daltons) oder mit einem römischen Zahlzeichen, das die relative Mobilität in der SDS-PAGE ausdrückt, gekennzeichnet. Späte Proteine sind unterstrichen. Proteine mit römischen Zahlzeichen sind Kapsidproteine. Als Präkursor synthetisierte Polypeptide tragen das Präfix p (z.B. pVI). Mit VA_1 und VA_2 sind die Genompositionen der beiden kleinen virusassoziierten RNAs bezeichnet. Die Kartenkoordinaten sind in Prozent des 35 000 bp großen Ad2 Genoms angegeben.
(entnommen aus Tooze, 1980)

von Polypeptiden von 40kD bis 47kD.

Der DNA-Gehalt des Zellextrakts wurde entweder durch eine Extraktion mit Polyäthylenglykol bei hoher Salzkonzentration (Alberts und Herrick, 1971; Van der Vliet und Levine, 1973) oder durch Präparation cytoplasmatischer Extrakte mit anschließender DNase-Behandlung (Rosenwirth et al., 1975; Sugawara et al., 1977) verringert, um die Reinigung der Proteine zu erleichtern. Diese Extrakte wurden dann gegen einen Puffer niedriger Salzkonzentration dialysiert und über Einzelstrang--DNA-Cellulosesäulen wie oben chromatographiert. Nach der Elution zwischen 0,5 - 2,0 M NaCl war das DBP zu 70 - 80 % rein.

Um die nichtspezifische Bindung zu minimalisieren und die Reinheit zu erhöhen, wurde ein Waschschritt mit Dextransulfat eingeführt (Levinson et al., 1976). Eine weitere Reinigung wurde durch Gelfiltration bei hoher Salzkonzentration und in Gegenwart von Detergentien erreicht (Sugawara et al., 1977). Mit dieser Methode konnten 0,12 mg mehr als 95% reines DBP aus 600 mg cytoplasmatischem Extrakt isoliert werden.

5 mg 95% reines DBP aus 250 mg Zellextrakt enthält man, wenn der Zellextrakt zuvor an DEAE-Cellulose fraktioniert wird, um DNA zu entfernen, und anschließend die Einzelstrang-DNA--Cellulose-Chromatographie durchgeführt wird (Linné et al., 1977; Linné und Philipson, 1980).

Ein Vergleich der tryptischen Peptide (Fingerprintanalyse) des 72kD DBP mit denen der Polypeptidspecies von 40 - 47kD zeigte, daß sie sich die meisten der methioninhaltigen Peptide teilen (Green et al., 1979b; Rosenwirth et al., 1976).

Mit den von Sugawara et al. (1977) ermittelten Werten läßt sich eine Tabelle der physikochemischen Eigenschaften des Ad2 DBP aufstellen:

Sedimentationskoeffizient	3,4S
Stokes' Radius	5,2 nm
Partielles Spezifisches Gewicht	0,725 g/cm^3
Kalkuliertes Molekulargewicht	73kD
Molekulargewicht nach SDS-PAGE	72kD
Reibungskoeffizient	1,88

Tabelle 2: Physicochemische Eigenschaften des Ad2 DBP

Werden diese Daten für sich allein betrachtet, so scheint DBP ein stark anisometrisches monomeres Polypeptid zu sein, daß sich nicht wie ein typisches globuläres Protein verhält.

Bei der Untersuchung der hydrodynamischen Eigenschaften eines Ad2 DBP von 98% Reinheit fanden Schechter et al. (1980), daß DBP einer konzentrationsabhängigen Selbstassoziation unterliegt. In Lösungen niedriger Ionenstärke (0,1 M NaCl) und geringer Proteinkonzentration ist die Selbstassoziation stark und führt zu Oligomeren. In Lösungen von 0,1 - 1,0 M NaCl nimmt die Assoziation ab, bei 1,0 M NaCl soll DBP aber immer noch als Trimer vorliegen. Die Autoren nehmen an, daß somit andere Einheiten als das Monomer in der Zelle an DNA binden. Hierzu tritt außerdem die Beobachtung, daß DBP an die Enden von Doppelstrang-DNA binden kann (Fowlkes et al., 1979; Schechter et al., 1980).

Die Kinetik der DBP-Synthese in adenovirusinfizierten Zellen wurde unter Verwendung verschiedener Methoden untersucht. Einzelstrang-DNA-Cellulosechromatographie mit anschließender SDS-PAGE (Van der Vliet und Levine, 1973), Analyse nach Radioimmunpräzipitation (Gilead et al., 1976) und Immunfluoreszenzstudien (Sugawara et al., 1977) zeigten, daß DBP 2 - 4 hpi nachzuweisen ist und die Synthese ein Maximum 11 hpi erreicht. 12 hpi nimmt die Synthese des DBP mit der zunehmenden Synthese später Proteine ab. Auch wenn die Ad2 DNA-Replikation gehemmt wird, geht die DBP-Synthese weiter.

Das DBP wird zunächst im Cytoplasma gefunden und beginnt sich 6 - 8 hpi im Kern zu akkumulieren. Mit DBP-Antiserum kann die nukleäre Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Sie tritt in Form von lokalen Punkten auf, die sich bei fortschreitender Infektion zu großen "Kügelchen" vereinigen (Sugawara et al., 1977).

In Experimenten mit "Pulse"- und "Pulse-Chase"-Markierungen konnten Jeng et al. (1977) zeigen, daß DBP ein Phosphoprotein ist. Nach einem 30-min. "Pulse" mit $[^{35}S]$-Methionin oder $[^{32}P]$-Orthophosphat läßt sich $[^{35}S]$- oder $[^{32}P]$-markiertes DBP mit einem nominellen Molekulargewicht von 74kD nachweisen. Schließt man an die 30 min. Markierung eine "Chase"-Periode von 20 h an, so erhält man ein $[^{35}S]$- oder $[^{32}P]$-markiertes DBP von 77kD. Die Erhöhung des Molekulargewichts ist auf die Phosphorylierung zurückzuführen. Beide Formen binden an Einzelstrang-DNA und werden von anti-DBP-Serum präzipitiert.

Die Modifikation neusynthetisierten DBPs durch Phosphorylierung ist durch weitere Arbeiten bestätigt worden (Russell und Blair, 1977; Levinson et al., 1977). Nach Axelrod (1978) befindet sich der Phosphatrest in Esterbindung an Serin- und Threoninresten des DBP: Durch Fingerprintanalyse von $[^{32}P]$-markiertem DBP konnten 2 - 3 Stellen zur Phosphorylierung aufgefunden werden. Linné et al. (1977) finden nach $[^{32}P]$-Markierung des DBP in ihrer Fingerprintanalyse nur ein tryptisches Peptid, das $[^{32}P]$ inkorporiert hat.

Die Affinität des DBP zu Einzelstrang-DNA wird nicht verringert, wenn 95% der Phosphatgruppen durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase entfernt werden (Levinson et al., 1977).

Es ist nicht geklärt, ob eine Proteinkinase oder eine andere Aktivität zum Phosphataustausch für die Modifikation verantwortlich ist.

Bereits Van der Vliet und Levine (1973), die als erste ein 72kD DBP aus mit Ad5 infizierten Nierenzellkulturen der Grünen Meerkatze (AGMK-Zellen) isolierten, unternahmen im Hinblick auf die Funktion des DBP im lytischen Zyklus Versuche mit zwei DNA-negativen temperatursensitiven Mutanten von Ad5,

H5ts36 (Wilkie et al., 1973) und H5ts125 (Ensinger und Ginsberg, 1972).

Extrakte aus H5ts36-infizierten AGMK-Zellen, die bei der für die Mutante nichtpermissiven Temperatur von 39,5°C gewachsen waren, enthielten sowohl das 72kD DBP als auch die 48kD Subspecies. In Extrakten aus mit der Mutante H5ts125 infizierten, bei nicht permissiver Temperatur gewachsenen Kulturen dagegen ließ sich keine Form des DBP nachweisen. Bei permissiver Temperatur (32°C) lagen 30 - 40% der Wildtypmenge an DBP vor.

Van der Vliet und Levine schlossen daraus, daß der DNA-negative Defekt in H5ts36 durch die Mutation in einem nicht mit dem DBP-Gen identischen Gen verursacht wird, während der durch H5ts125 hervorgerufene Defekt innerhalb des DBP-Gens liegen müsse. Nach einer Verfeinerung ihrer Methoden (Einzelstrang-DNA-Cellulosechromatographie und SDS-PAGE) konnten Van der Vliet et al. (1975) zeigen, daß in H5ts125-infizierten Kulturen bei nichtpermissiver Temperatur weniger als 5% der Wildtypmenge an DBP nachweisbar waren.

Die H5ts125 Mutante codiert bei nichtpermissiver Temperatur für ein thermolabiles DBP, das die Fähigkeit für eine kontinuierliche Bindung an Einzelstrang-DNA verloren hat, denn wenn DBP-Species nach H5ts125-Infektion von Einzelstrang-DNA--Cellulosesäulen mit Puffern ansteigender Temperatur (Thermale Elution) eluiert wurden, erschienen die H5ts125-Proteine bei niedrigeren Temperaturen als die Wildtyp- oder H5ts36--Proteine.

In zwei auf diesen Ergebnissen aufbauenden Arbeiten (Van der Vliet und Sussenbach, 1975; Van der Vliet et al., 1977) postulierten die Autoren, daß Ad5-Wildtyp-DBP sowohl bei der Initiation der adenoviralen DNA-Replikation als auch bei der Elongation naszierender DNA-Ketten erforderlich sei. Nach der Infektion von KB-Zellen mit H5ts125 bei nichtpermissiver Temperatur bleiben die erste und weitere Runden der DNA-Replikation aus: Das thermolabile DBP kann die Initiation nicht einleiten.

In einem in vitro System zur DNA-Synthese aus isolierten Kernen von KB-Zellen, in dem keine neuen Replikationsrunden initiiert werden können, wird auch nach H5ts125-Infektion replizierende DNA in reife DNA bei nichtpermissiver Temperatur umgesetzt: Der Defekt im H5ts125DBP schien sich auf die Elongation der DNA nicht auszuwirken. In diesem in vitro System wurde auch die DNA-Syntheserate in Gegenwart eines Antikörpers gegen gereinigtes DBP verfolgt: Es wurde eine Inhibition der viralen DNA-Synthese von 50 - 60 % beobachtet, die zelluläre DNA-Synthese war nicht beeinträchtigt.

Die DBP-Präparation besaß noch zelluläre Kontaminanten, und die Autoren konnten die Möglichkeit nicht ausschließen, daß damit auch Antikörper gegen eine hochimmunogene Kontaminante im in vitro System vorlagen, die das Wachstum der DNA-Ketten inhibierten. Nach diesem Modell soll der Antikörper die Duplikation komplementärer DNA-Stränge durch Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit der Replikationsgabel in aktiv replizierender DNA behindern.

In vivo Experimente von Ginsberg et al. (1977) zeigten zusätzlich, daß H5ts125 DBP bei nichtpermissiver Temperatur abgebaut wird, ebenso liegen nur geringe Mengen immunreaktiven Proteins bei der nichtpermissiven Temperatur vor. Das bei permissiven Temperaturen entstandene immunreaktive DBP kann nach "Shift" zur nichtpermissiven Temperatur nicht mehr mit DBP-Antikörper reagieren.

In einem löslichen DNA-Replikationssystem mit nukleären Extrakten aus H5ts125-infizierten HeLa-Zellen ließ sich der thermosensitive Defekt in der DNA-Replikation bei nichtpermissiver Temperatur durch die Zugabe von Wildtyp 72kD DBP komplementieren, die virale DNA-Replikation betrug danach 74% der Normalwerte (Horwitz, 1978). Die Kettenverlängerung lief geordnet ab und es wurden DNAs von voller Genomlänge produziert. Der DNA-negative Defekt ließ sich durch Zugabe von H5ts125-thermolabilem DBP nicht aufheben (Kaplan et al., 1979).

Auf elektronenmikroskopischen Bildern von DNA-Proteinkomplexen, die 17hpi in Ad2-infizierten HeLa-Zellkernen gefunden wurden, kann in situ die Bindung von DBP an replikative Intermediate aufgezeigt werden (Kédinger et al., 1978). Diese Nukleoproteinkomplexe sind mit 20 nm wesentlich dicker als doppelsträngige DNA (2 nm Durchmesser).

Nach Reinigung dieser Komplexe können drei Typen unterschieden werden: a) gleichmäßig dicke lineare Filamente von Genomlänge, b) lineare Komplexe von Genomlänge, die aus einem 20 nm dicken Fragment und einem Abschnitt von der Dicke doppelsträngiger DNA bestehen, c) gegabelte Komplexe aus einem dicken Filament, das mit einem dünnen Doppelstrangfilament von Genomlänge verbunden ist. Sowohl dicke als auch dünne Filamente können von DNase verdaut werden, aber nur die dikken Fragmente werden von der einzelstrangspezifischen Neurospora crassa-Nuklease angegriffen. 72kD DBP wurde in diesen Filamenten durch Reaktion mit anti-72kD DBP-Immunglobulin nachgewiesen. Beide replizierende Stränge des Ad2 Genoms sind dicht mit DBP besetzt.

Van der Vliet et al. (1978) fanden in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, daß DBP einzelsträngige DNA in statu nascendi in eine Konfiguration bringt, die verhindert, daß sich die Replikationsgabel wieder verengen kann ("extended configuration"). Die Autoren untersuchten auch Parameter der Bindung an Einzelstrang-DNA: Sie ist unabhängig von der Gegenwart zweiwertiger Kationen und Sulfhydrylgruppen, effektiv über einen weiten pH-Bereich und bei niedrigen Protein-DNA--Raten kooperativ. Bei einer maximalen kooperativen Protein--DNA-Rate von 33 soll 1 Proteinmolekül an einen Bereich von 7 Nukeotiden binden.

Vorläufige Untersuchungen zur Einzelstrang-DNA-bindenden Domäne im DBP zeigen folgendes Bild: Nach kontrollierter Verdauung mit Chymotrypsin entstehen zwei DBP-Spaltprodukte von ca. 45kD und 25kD. Das 45kD-Polypeptid enthält die meisten Methioninreste, aber keine Phosphatgruppen. Das 25kD-Polypeptid enthält alle Phosphatgruppen und zeigt keine Bindung an Einzelstrang-DNA (Linné und Philipson, 1980). Das

44 - 45kD-Polypeptid hingegen bindet an Einzelstrang-DNA und kann Wildtyp-72kD DBP im H5ts125-Defektsystem ersetzen (Ariga et al., 1980).

Bei kontrollierter Spaltung von DBP mit Trypsin entsteht zunächst ein Spaltprodukt von 51kD, das nach weiterer Inkubation zu einem 35kD-Polypeptid abgebaut wird. Nach der Zugabe saturierender Mengen von DNA zur Lösung des 51kD-Spaltprodukts kann Trypsin dieses nicht weiter zum 35kD-Polypeptid abbauen. Gebundene DNA scheint eine trypsinsensitive Position im 51kD--Produkt zu schützen: Zumindest ein Teil der Bindungsregion sollte im 51kD-Produkt liegen (Schechter et al., 1980).

Die Funktion des DBP im lytischen Zyklus ist nicht auf seine Beteiligung an der DNA-Replikation beschränkt.

Zunächst sprechen einige Resultate für eine Rolle des DBP bei der Regulation der Genexpression früher viraler Gene. Im Cytoplasma von mit H5ts125 bei nichtpermissiver Temperatur infizierten Zellen akkumulieren sich 3 - 7 x soviele mRNA--Species, die zu allen vier frühen Genblöcken hybridisieren, als im Cytoplasma von mit Wildtyp-Ad5 infizierten Zellen. Bei permissiver Temperatur ist dieser Unterschied in der mRNA--Akkumulation zwischen H5ts125 und Wildtyp Ad5 nicht vorhanden (Carter und Blanton, 1978). Die vom Wildtyp DBP ausgeübte negative Regulation der frühen mRNA-Akkumulation scheint also vom thermolabilen DBP der Mutante aufgehoben zu werden.

Die negative Kontrolle durch Wildtyp DBP betrifft auch die Akkumulationsrate der DBP mRNA selbst: Eine Autoregulation der DBP-Synthese ist also nicht auszuschließen (Blanton und Carter, 1979). Besonders ausgeprägt ist die Repression durch Wildtyp DBP in der Expression der frühen Region 4, die das Resultat eines Initiationsblocks der Transkription sein soll (Nevins und Winkler, 1980).

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß die relativ kurzen biologischen Halbwertszeiten der frühen adenoviralen mRNAs, in der Größenordnung von 5 - 10 min., nach der Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid um das 6 bis 8fache ansteigen (Craig und Raskas, 1974).

Ad2 besitzt vier gut charakterisierte Wirtsbereichsmutanten (Ad2hr400 – Ad2hr403), die den Block im Wildtyp Ad2 für das Wachstum in Affenzellen überwinden. Die Änderungen in diesen Mutanten erlauben die vollständige Expression später viraler Gene und die Mutanten codieren für ein diffusibles Produkt, das sogar die späte Genexpression für Wildtyp Ad3, das nicht zur gleichen Untergruppe gehört wie Ad2 und Ad5, in Affenzellen ermöglicht. Die Mutationen liegen im Genblock für das DBP, sodaß dem DBP auch eine Funktion in der Regulation der späten viralen Genexpression zugewiesen werden kann (Klessig und Grodzicker, 1979).

Schon Van der Vliet und Levine (1973) haben nach einer enzymatischen Aktivität des DBP gesucht. Danach besitzt DBP keine Eigenschaften, die einer Nuklease-, DNA Polymerase-, Thymidinkinase- oder Desoxycytidinkinaseaktivität entsprächen.

Nass und Frenkel (1980) sprachen dem DBP die Aktivität eines DNase-Inhibitors zu, was mit der DNaseempfindlichkeit der von Kedinger et al. (1978) beschriebenen mit 72kD DBP dicht besetzten einzelsträngigen Replikationsintermediate nicht vereinbar wäre. Allerdings benutzten Nass und Frenkel ein in vitro System mit gereinigtem DBP, und die DNase-Inhibitoraktivität des adenoviralen DBP war von der eines zellulären DNA-Bindungsproteins zu unterscheiden (Nass und Frenkel, 1979).

Das zu den defekten Parvoviren zählende Adenoassoziierte Virus (AAV) kann nur effizient in Zellen wachsen, die auch mit Adenovirus infiziert sind. Diese Adenovirus-Helferfunktion ist in den Mutanten H5ts125 und H5ts107 (ebenfalls eine Mutante mit einer temperatursensitiven Läsion im DBP-Gen) bei nichtpermissiver Temperatur aufgehoben. Mit H5ts125 oder H5ts107 infizierte KB-Zellen produzierten um den Faktor 10^2 geringere Mengen an AAV-Kapsidproteinen und AAV-Virionen.

H5ts125-Infektion bei nichtpermissiver Temperatur behindert die Akkumulation einiger der cytoplasmatischen mRNAs des AAV. Wildtyp DBP kann also eine positive Kontrolle bei der Transkription oder beim posttranskriptionellen Processing von AAV mRNA ausüben (Myers et al., 1980).

Nach Infektion von mit Cycloheximid behandelten KB-Zellen mit Ad2 konnten Büttner et al. (1974) mehrere Species polysomaler früher virusspezifischer mRNAs isolieren, die zu beiden getrennten Strängen des Ad2 Genoms homolog waren. Den Hauptanteil früher viraler mRNA machten zwei homogene RNA-Species von 19-20S aus, ein Transkript vom r-Strang mit einem Molekulargewicht von $7,4 \times 10^5$ Daltons und ein Transkript vom l--Strang mit einem Molekulargewicht von $7,7 \times 10^5$ Daltons. Bezogen auf die Codierungskapazität mußte sich unter diesen Transkripten auch die mRNA für das DBP befinden.

Heterotypische Rekombination und Kartierung mit Restriktionsendonukleasen erlaubten Grodzicker et al. (1974, 1977), die H5ts125-Mutation auf der physikalischen Karte des Ad5 Genoms zwischen den Positionen 59 - 71 zu lokalisieren. Eine 20S mRNA, die vom l-Strang im EcoRI B-Fragment des Ad2 Genoms (Kartenpositionen 58,5 - 70,7) transkribiert wird, wurde bald darauf von Büttner et al. (1976) präparativ isoliert. In vitro Translation dieser virusspezifischen mRNA führte zur Synthese eines 72kD-Polypeptids, das durch Immunpräzipitation als 72kD DBP identifiziert wurde (Lewis et al., 1976).

Reife polysomale DBP mRNAs, die ca. 2 kb lang sind, entstehen aus nukleären Transkripten nach Polyadenylierung und Spleißvorgängen. Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen R-Loop-Kartierung (Thomas et al., 1976) gelang es Kitchingman et al. (1977), in Hybridmolekülen aus Ad2 DNA-Einzelsträngen, von denen frühe mRNAs nach links transkribiert werden, und mRNA--Präparationen, die früh in der Infektion (8 hpi) aus cytoplasmatischen oder polysomalen Extrakten gewonnen wurden, die Positionen der codogenen und nicht codogenen DNA-Abschnitte für mRNAs der frühen Regionen 2 und 4 zu ermitteln.

Danach sieht die Struktur früher DBP mRNA folgendermaßen aus: Eine erste 5'-terminale Führungssequenz bei den Koordinaten 75,2 - 75,1 wird an eine zweite Führungssequenz bei den Koordinaten 68,6 - 68,4 und diese wiederum an den Hauptkörper der mRNa zwischen den Koordinaten 66,6 - 61,8 gespleißt.
Berk und Sharp (1977, 1978) erhielten nach gelelektrophoretischer Auftrennung von mit S1Endonuklease verdauten DNA:RNA--Hybriden sehr ähnliche Werte für frühe DBP mRNA.

Nach der Zerlegung und Kartierung des EcoRI B-Fragments von Ad2 DNA in seine BglII- und HincII-Subfragmente konnte frühe polysomale [^{3}H]-uridinmarkierte DBP mRNA durch *in situ* Hybridisierung in Agarosegelen (Southern, 1975) jenen Subfragmenten zugeordnet werden, die seinen 3'- und 5'-Termini homolog waren (Adamkiewicz et al., 1978). Die Autoren ermittelten folgende Koordinaten: 61,1 $\pm$ 0,4 für den 3'-Terminus und 68,4 $\pm$ 0,4 für den 5'-Terminus. Diese Bestimmung schließt also nur die zweite Führungssequenz mit ein, da das EcoRI B--Fragment bei der Position 70,7 endet.

Das Spleißmuster der frühen DBP mRNA kann auch *in vitro* erzeugt werden: Aus einem nukleären, poly(A)-terminierten Transkript von ca. 5 kb Länge (28SPräkursor) ließ sich in einem System von Kernen aus hypotonisch geschwollenen HeLa--Zellen unter Zusatz einer cytoplasmatischen Fraktion eine ca. 2 kb lange RNA erzeugen, die sich wie eine DBP mRNA verhielt (Blanchard et al., 1978). Die Existenz dieses 28SPrimärtranskripts wurde bestätigt, und nach Excision der intervenierenden Sequenzen zwischen der 1. und 2. Führungssequenz und anschließender Ligation wurde eine 23SZwischenform gefunden, die dann nach weiterer Excision und Ligation zur reifen 20SmRNA prozessiert wird (Goldenberg und Raskas, 1979, 1980; Goldenberg et al., 1981).

Eine weitere elektronenmikroskopische Analyse von R-Loops in DNA:RNA-Hybriden, deren mRNAs 6, 13, 16 und 22 hpi präpariert worden waren, zeigte, daß die relative Häufigkeit der frühen Form der DBP mRNA mit der Zeit abnahm und die Synthese einer späten DBP mRNA mit der ersten Führungssequenz bei den Positionen 72,0 - 71,9 zunahm (Chow et al., 1979). Die prozentuale Konzentration der späten Form der DBP mRNA lag 6 hpi bei 9% und 13 hpi bereits bei 58% aller DBP mRNA-Species. 22 hpi waren 90% der DBP mRNA-Species dieser späten Form, weniger als 5% der beschriebenen frühen Form und wechselnde prozentuale Mengen einem Typ mit der ersten Führungssequenz bei den Koordinaten 86,7 - 86,2 zuzuordnen.

Des weiteren wurden einige seltene DBP mRNA-Species gefunden, die im 5'-terminalen Bereich Führungssequenzen aus der Region des frühen Genblocks 4 (99,3 - 94,4) besitzen. Die späte Form

des DBP-Transkripts erwies sich nach zellfreier Translation mit einer 22 hpi isolierten polysomalen RNA-Präparation als funktionelle mRNA, die zur Synthese des 72kD DBP führte.

Die Struktur der ersten Führungssequenz in der frühen Ad2 DBP mRNA konnte nach ^{32}P-Markierung in vivo durch Filterhybridisierung an das EcoRI F-Fragment des Ad2 Genoms, dessen Nukleotidsequenz aufgestellt worden war (Galibert et al., 1979), bestimmt werden (Baker et al., 1979). Die durch RNA-Fingerprinttechniken nach RNase T1 und RNase A-Verdauung ermittelte RNA-Sequenz wurde mit der DNA-Sequenz im EcoRI F-Fragment verglichen: Bei der Koordinate 75,1 liegt die 68 Nukleotide lange Region der ersten Führungssequenz. Die DNA-Sequenz, die die Führungssequenz am 3'-Ende überlappt, enthält eine Donorregion, um die erste Führungssequenz an die zweite spleißen zu können.

Die Sequenz in der Spleißregion zeigt eine Homologie von 7 Basen mit der vergleichbaren Struktur der späten gemeinsamen Führungssequenz von Ad2 (Akusjärvi und Pettersson, 1979) und einer Spleißregion in der mRNA für Mausglobin (Konkel et al., 1978).

Die DNA-Sequenz oberhalb der mRNA-Kappenstruktur, die Region des möglichen Promotors, enthielt aber keine mit der von Pribnow (1975) beschriebenen "TATAAT"-Box vergleichbare Basenfolge. Zusätzlich existieren zwei unterschiedliche Kappenstrukturen am 5'-Ende der mRNA: m^7GpppA und m^7GpppG, die von benachbarten Positionen in der DNA codiert werden und so zu DBP mRNAs gehören, die sich um ein versetzt angeordnetes Nukleotid am 5'-Ende in der Länge unterscheiden. Diese versetzte Anordnung und das Fehlen der Promotorbox unterscheiden die DBP mRNAs von vielen viralen und zellulären mRNAs. Sie ähneln in diesen Punkten allerdings den späten mRNAs von SV40 und Polyomavirus.

Folgende Daten liegen über die Länge des primären Transkripts vor. Weber et al. (1980) fanden, daß ein ungespleißtes nukleäres RNA-Molekül eine Transkriptionseinheit darstellt, deren Länge von den Koordinaten für die Initiation der RNA-Transkription und den Koordinaten für die Poly(A)-Addition bestimmt wird. Die gleiche Arbeitsgruppe kommt wenig später zu

dem Resultat, daß die Transkription erst nach der Codierung für die Poly(A)-Anheftungssequenz weiter zum 3'-Ende hin terminiert wird. Dies bedeutet aber, daß die Positionen für die Poly(A)-Anheftungssequenz erst durch eine endonukleolytische Spaltung der mRNA an das 3'-Ende der reifen mRNA gerückt werden (Nevins et al., 1980).

Um die 3'terminale Region der DBP mRNAs genau zu lokalisieren, wurde das kleine Restriktionsfragment BglII J/AluI-2 (Kartenpositionen 61,51 - 62,34) des Ad2 Genoms, welches effektiv zu poly(A)-tragenden Fragmenten der frühen DBP mRNA hybridisiert, mit Restriktionsendonukleasen genau kartiert. Beide Stränge des BglII J/AluI-2-Fragments (296 Nukleotide) wurden dann mit der Technik von Maxam und Gilbert (1977, 1980) sequenziert (Büttner und Veres-Molnar, 1980 ; Veres-Molnar et al., 1981).

Das wahrscheinliche Poly(A)-Additionssignal AATAAA für die DBP mRNA wurde in einem Abstand von 135 Nukleotiden von der AluI-Schnittstelle bei der Kartenposition 61,51 identifiziert. Auf dem oppositionellen DNA-Strang in einem Abstand von 114 Nukleotiden von der gleichen AluI-Schnittstelle ließ sich das wahrscheinliche Poly(A)-Additionssignal für die mRNA des 23kD-Proteins, die dieses Signal mit der Hexon mRNA gemeinsam besitzt, lokalisieren (Akusjärvi et al., 1981).

In Fortsetzung dieser Arbeiten zur Kartierung und Sequenzierung des DBP-Gens sollte es das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, zwei BglII-Subfragmente des EcoRI B-Fragments von Ad2 DNA mit einigen geeigneten Restriktionsendonukleasen genau zu kartieren und danach die genomische Information in diesen Subfragmenten, die für den Hauptkörper der DBP mRNA codieren, nach der von Maxam und Gilbert beschriebenen Sequenzierungsmethode basengenau zu bestimmen.

Die aufgestellte Sequenz für die DBP mRNA sollte es ermöglichen, die hypothetische Aminosäuresequenz für das Ad2 DBP abzuleiten sowie die Erkennungssequenzen vieler Endonukleasen und weiterer genetischer Signale auf der DNA zu bestimmen.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Zellen und Virus

1. Medium zur Zellzucht

Minimum Essential Medium (MEM) in der Modifikation nach Joklik für Suspensionskulturen mit L-Glutamin, 10XPhosphat, 75 units/ml Penicillin-G, 50 µg/ml Streptomycin und 2 g $NaHCO_3$/l (Grand Island Biological Company, USA, Cat. No.: 410 - 1300).

2. Zellen

In allen Fällen wurde eine clonierte Unterlinie von KB-Zellen, einer etablierten humanen Zellinie, verwendet.

3. Virus

Die KB-Suspensionskulturen wurden mit dem Stamm 38-2 des Adenovirus Typ 2 infiziert (Parsons und Green, 1971; Fujinaga et al., 1968). Ad2-Virionen wurden aus CsCl-Gradienten isoliert und Ad2 DNA aus den Virionen extrahiert (Landgraf-Leurs und Green, 1971).

II. Analyse viraler DNA-Fragmente

1. DNA-Markermoleküle

Durch den Vergleich der Migrationsweiten gelelektrophoretisch aufgetrennter doppelsträngiger DNA-Fragmente mit den Migrationsweiten von DNA-Fragmenten exakt bekannter Länge (in Basenpaaren) wurde die Länge der untersuchten Ad2 DNA-Fragmente bestimmt.

Nach Sequenzanalyse basengenau bestimmte Markermoleküle sind die Restriktionsfragmente der DNAs des Bacteriophagen ØX 174 und des E.coli-Plasmids pBR 322, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.1. Bacteriophage ØX 174 am 3

Nach den Vorschriften von W. Rüger, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum, wurde ØX 174 am 3 gezüchtet und die Replikative Form I der Phagen--DNA isoliert.

Die DNA-Sequenz für das Genom von ØX 174 mit 5375 Nukleotiden ist bestimmt worden (Sanger et al., 1977).

HaeIII-Fragmente von ØX 174 am 3 RFI DNA (Lee und Sinsheimer, 1974) wurden unmarkiert oder nach 5'-Endmarkierung mit ^{32}P als Eichfragmente in der Polyacrylamidgelelektrophorese benutzt. Die Länge der HaeIII-Fragmente in bp ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Fragment	Nukleotidnummern[x]	Rel. Größe in bp
1	1780-3121	1342
2	3122-4199	1078
3	4939-5375/1-435	872
4	1174-1779	606
5	670-979	310
6a	4478-4748	271
6b	4200-4477	278
7	436-669	234
8	980-1173	194
9	4749-4866	118
10	4867-4938	72

Tabelle 3: HaeIII-Fragmente von ØX 174 RFI DNA
[x]Nummerierung nach Sanger et al., 1977

1.2. Plasmid pBR 322

Das E.coli-Plasmid pBR 322 (Tc^r, Ap^r) ist nach Vorschriften von Bolivar et al. (1977) gezüchtet und isoliert worden. Die Nukleotidsequenz von pBR 322 DNA ist aufgestellt worden (Sutcliffe, 1979).

HpaII-Fragmente von pBR 322 DNA (Sutcliffe, 1978) wurden unmarkiert oder nach 5'-Endmarkierung mit ^{32}P als Eichfragmente in der Polyacrylamidgelelektrophorese benutzt. Die Länge der HpaII-Fragmente ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Fragment	Nukleotidnummern[x]	Rel. Größe in bp
1	3901-4362/1-161	622
2	2154-2681	527
3	3044-3448	404
4	1811-2120	309
5	3659-3901	242
6	1019-1257	238
7	170-387	217
8	1283-1484	201
9	2854-3044	190
10	1484-1664	180
11a	533-693	160
11b	769-929	160
12a	1664-1811	147
12b	2681-2828	147
13	411-533	122
14	3549-3659	110
15	929-1019	90
16	693-769	76
17	3482-3549	67
18a	2120-2154	34
18b	3448-3482	34
19a	1257-1283	26
19b	2828-2854	26
20	387-402	15
21a	161-170	9
21b	402-411	9

Tabelle 4: HpaII-Fragmente von pBR 322 DNA
[x]Nummerierung nach Sutcliffe, 1978

Für einen Teil der Sequenzierungsarbeiten ist das EcoRI B--Fragment von Ad2 DNA in pBR 322 als Vektor nach Amplifikation mit Chloramphenicol in E.coli Hb 101 cloniert worden, wofür ich Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Büttner danke.

2. Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen AluI, AvaI, BalI, BamHI, BglII, EcoRI, FnuDII, HaeII, HaeIII, HhaI, HpaII, HphI, HincII, HinfI, KpnI, Sau96I und XhoI wurden nach biochemischen Standardprozeduren wie Ammoniumsulfatfraktionierung, Phosphocellulose-, DEAE-Cellulose- und Hydroxylapatitchromatographie, Gelfiltration, Heparinagarose- und Aminoalkylagarose-Affinitätschromatographie isoliert und bis zur funktionellen Einheitlichkeit, d.h. bis zur ausreichenden Exonukleasefreiheit, gereinigt.

Einige der aufgeführten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Bethesda Research Labs, Neu-Isenburg (BRD), Boehringer Mannheim (BRD) und New England Biolabs, Beverly (USA) bezogen.

Bacillus amyloliquefaciens H (Produzent von BamHI), Bacillus globigii (Produzent von BglII) und Escherichia coli RY13 (Produzent von EcoRI) konnten im Großfermenter des Lehrstuhls für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum kultiviert werden, wofür ich Herrn Prof. Dr. U. Winkler herzlich danken möchte.

Übersichten über Restriktionsendonukleasen geben Roberts (1980) und Zabeau und Roberts (1979).

3. Restriktion viraler DNA-Fragmente mit Endonukleasen

Als Endodesoxyribonukleasen erkennen alle Restriktionsendonukleasen spezifische Nukleotidsequenzen in doppelsträngiger DNA und schneiden beide Stränge der Duplex-DNA. Aber nicht alle Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an definierter Position. Sequenzspezifisch schneiden die Restriktionsenzyme der Klassen II und III.

Die Enzyme der Klasse III benötigen ATP und Mg^{2+} als Kofaktoren und werden nur durch S-Adenosylmethionin stimuliert. Für die Zergliederung von Genomen oder DNA-Fragmenten sind sie begrenzt einsetzbar.

Die Enzyme der Klasse II benötigen Mg^{2+} und ein bestimmtes Puffermilieu für die Entfaltung ihrer Aktivität. Sie schneiden an definierter Position in ihren Erkennungssequenzen oder eine bestimmte Anzahl von Nukleotiden von ihren Erkennungssequenzen entfernt. Nur diese Restriktionsendonukleasen sind bei der Analyse des Ad2 DBP-Gens verwendet worden.

3.1. Puffer und Lösungen für die Restriktionsansätze

Die Puffer wurden 10fach konzentriert hergestellt und im jeweiligen Verdauungsansatz mit H_2O bidest. auf die einfache Konzentration gebracht.

1. BalI/BglII-Puffer:	10,0	mM Tris-HCl pH=7,4
	10,0	mM $MgCl_2$
	6,0	mM KCl
	1,0	mM DTT
2. EcoRI-Puffer:	100,0	mM Tris-HCl pH=7,9
	10,0	mM $MgCl_2$
	50,0	mM KCl
	0,1	mM EDTA
	1,0	mM DTT
3. EcoRII-Puffer:	100,0	mM Tris-HCl pH=8,0
	5,0	mM $MgCl_2$
	100,0	µg/ml BSA
	5,0	mM DTT
4. HincII/H.suisI-Puffer:	10,0	mM Tris-HCl pH=7,4
	6,6	mM $MgCl_2$
	6,0	mM 2-Mercaptoäthanol
	60,0	mM NaCl
5. Titrationspuffer:	10,0	mM Kaliumphosphatpuffer pH=7,5
	0,1	mM EDTA pH=7,4
	12,8	mM 2-Mercaptoäthanol
	100,0	µg/ml BSA
	10,0	% Glycerin (v/v)

6. 1 M oder 0,1 M Dithiothreitol (DTT). Es wurden zumeist Lösungen von 1 ml hergestellt und bei -20°C aufbewahrt.
7. 500 µg/ml BSA in Eppendorf-Caps, Aufbewahrung bei -20°C.
8. TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH=7,4; 2 mM EDTA pH=7,4, zur Lösung von DNA.

3.2 Restriktion unmarkierter DNA-Fragmente

Die Volumina dieser Verdauungsansätze richten sich nach der Konzentration des unmarkierten Fragments, der Aktivität der verwendeten Restriktionsendonuklease* und dem Typ der Gelelektrophorese. Während für analytische Agarosegele Volumina von 50 - 100 µl angebracht sind, sollten sie für analytische Polyacrylamidgele höchstens 50 µl betragen, Proben von 20 µl lassen sich gut als konzentrierte Bande auflagern. Als repräsentatives Beispiel sei die Verdauung von je 1 µg EcoRI B/BglII C-Fragment mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen aufgeführt:
Vom EcoRI B/BglII C-Fragment standen 47,5 µg/1 ml TE-Puffer zur Verfügung. 1 µg Fragment sollte sich in 50 µl Verdauungsansatz befinden. Die Probe sollte mit 8 Endonukleasen verdaut werden, also wurde folgender Ansatz benötigt:

40 µl 10fach BalI/BglII-Puffer
190 µl H_2O bidest.
2 µl 1M DTT (Endkonzentration: 5 mM)
168 µl EcoRI B/BglII C-Fragment
$\sum$=400 µl

Jeweils 50 µl dieses Ansatzes wurden auf 8 Eppendorf-Hütchen verteilt und mit je 5 µl Restriktionsendonuklease versetzt. Dieser große Aktivitätsüberschuß wurde gewählt, um unter allen Umständen vollständige Verdauungen zu erhalten. Danach wurde 1h bei 37°C inkubiert und die Probe mit 1/5 Volumen des Verdauungsansatzes ≙ 10 µl an Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch (s. 4.1.) gemischt. Anschließend wurde sofort die Elektrophorese auf 1,4% Agarosegelen durchgeführt.

---

* 1 Einheit (1U) einer Restriktionsendonuklease ist definiert als die Menge, die für die komplette Verdauung von 1 µg λDNA in 1h bei 37°C notwendig ist.

3.3. Restriktion 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente

Die Volumina dieser Verdauungsansätze richten sich vorwiegend nach der Radioaktivität der doppel- oder einzelsträngig 5'-endmarkierten Fragmente, die vor dem Ansatz der Verdauung bestimmt wurde. Zwei Zählmethoden sind verwendet worden:

Im ersten Fall wurde ein Aliquot (0,5 - 1,0 µl) mit Packard Aqueous Scintillator gemischt und die Radioaktivität im Packard Tri-Carb Flüssigszintillationsspektrometer B 2450, eingestellt auf den ^{32}P-Kanal, bestimmt.

Im zweiten Fall wurde das Eppendorf-Hütchen mit der Gesamtmenge an markiertem Fragment in ein Zählgefäß gesetzt, und die Aktivität der Probe durch Messung der Cerenkov-Strahlung im ^{3}H-Kanal des Flüssigszintillationsspektrometers bestimmt. Die Cerenkov-Messung war insbesondere dann angebracht, wenn Fragmente nach 5'-Endmarkierung als feste Präzipitate vorlagen, und das Volumen der Verdauungsansätze auf die vorhandene Aktivität eingestellt werden sollte.

Man muß sich aber vor Augen halten, daß die Messung der Cerenkov-Strahlung auf Grund von Fehlern in der Zählgeometrie, bei wechselnden Probenvolumina und dem Vorhandensein von Kontaminanten, die zur Quenchung führen, nie zu absoluten Zählraten führt, sondern nur eine Abschätzung der Radioaktivität erlaubt. Sie ist andererseits ein geeignetes Verfahren, sehr wertvolle Proben zerstörungsfrei zu messen und wurde zur Erfolgskontrolle bei der Reinigung oder Aufarbeitung endmarkierter Fragmente sowie während der verschiedenen Schritte der Sequenzierung nach Maxam und Gilbert eingesetzt.

Als repräsentatives Beispiel sei die Verdauung des doppelsträngig markierten BglII J/HpaII-3-Fragments von 1×10^5 cpm Aktivität mit BalI aufgeführt:
Das Fragment wurde in 10 µl sterilem H_2O bidest. bei 50°C gelöst. 3 µl ≙ 3×10^4 cpm Aktivität wurden als Reserve und Kontrolle abgenommen. Die restlichen 7 µl wurden übernacht mit BalI in folgendem Ansatz bei 37°C verdaut:

2 µl 10fach BalI/BglII-Puffer
6 µl H_2O bidest.
1 µl o,1 M DTT
4 µl BSA 500 µg/ml (Endkonzentration: 2 µg/20 µl)
7 µl BglII J/HpaII-3-Fragment
Σ=20 µl
+ 2 µl BalI-Lsg.

Nach der Inkubation wurden der Probe 1,57 µl ≙ $5x10^3$ cpm Aktivität entnommen und der Rest bei -20°C eingefroren. Dieses Aliquot und ein weiteres von 0,25 µl ≙ $2,5x10^3$ cpm Aktivität aus der BglII J/HpaII-3-Reserve wurden mit 10 µl sterilem H_2O bidest. und 2,5 µl Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch gemischt und unter Verwendung von 5 µl 5'-endmarkierten HpaII--Fragmenten von pBR 322 (s. 1.2.) als Größenstandard auf 10% Polyacrylamidgelen getrennt.

Nach dem Lauf und einer 24-stündigen Röntgenfilmexposition (s. 4.4.2.) wurde das Bandenmuster beurteilt und ausgewertet. Da die Verdauung komplett war und zum erwarteten Resultat geführt hatte, konnte der eingefrorene Rest des BalI-verdauten BglII J/HpaII-3-Fragments nun auf die Verdauung mit anderen Endonukleasen analog dem obigen Verdauungsansatz vorbereitet werden.

3.4. Partialverdauung singulär 5'-^{32}P-endmarkierter DNA--Fragmente zur Kartierung nach Smith und Birnstiel

Wird doppelsträngige DNA, die am 5'-Ende nur eines Strangs ^{32}P-endmarkiert ist (die singuläre Markierung entsteht durch sekundäre asymmetrische Spaltung eines an beiden 5'-Enden endmarkierten Fragments mit einer Endonuklease), mit suboptimalen Mengen Endonuklease verdaut, so entstehen Partialverdauungsprodukte, die aus zwei oder mehr Fragmenten, wie sie bei der Totalverdauung anfallen würden, zusammengesetzt sind. Unter allen Partialverdauungsprodukten entstehen auch jene, die immer aus dem 5'-endmarkierten und seinem benachbarten Fragment, bzw. seinen weiteren benachbarten Fragmenten gebildet werden.

Die zeit- oder konzentrationsabhängigen Parameter der Verdauung können so eingestellt werden, daß alle 5'-endmarkierten Partialverdauungsprodukte entstehen, die im Autoradiogramm eines analytischen Polyacrylamidgels nachgewiesen werden können.

Die Abfolge der endmarkierten Banden im Autoradiogramm stellt somit ein additives Bild der tatsächlichen Organisation der Subfragmente im partialverdauten Fragment dar. Bei Kenntnis der Größe der Subfragmente, bestimmt in Totalverdauungen, kann die physikalische Kartierung der Subfragmente im analysierten Fragment vorgenommen werden (Smith und Birnstiel, 1976).

Die Partialverdauung des singulär endmarkierten EcoRI B/ BglII C/ BalI H-Fragments mit der Endonuklease HaeIII diene als Beispiel:
Die HaeIII-Stammlösung wurde 1:10 in Titrationspuffer (s.3.1.) verdünnt. Verdauungsansatz:

25,0 µl BalI/BglII-Puffer (10fach)
112,5 µl H_2O bidest.
12,5 µl 0,1M DTT
100,0 µl EcoRI B/BglII C/BalI H-Fragment
Σ=250,0 µl

Jeweils 50 µl dieses Ansatzes wurden auf 5 Eppendorf-Hütchen verteilt. Zugesetzt wurden ansteigende Mengen HaeIII-Verdünnung 1:10: 1,2, 5 und 10 µl sowie 2 µl HaeIII unverdünnt. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurden entsprechende Volumina Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch zugesetzt, 5 min. bei 65°C erhitzt und ein 4%Polyacrylamidgel mit den Proben beladen.

4. Analytische Gelelektrophoresen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarose- oder Polyacrylamidgelen.

Agarosegele wurden benutzt, wenn Enzympräparationen ausgetestet wurden oder wenn festgelegt werden sollte, mit welcher Häufigkeit Ad2 DNA-Fragmente von Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden, d.h. in allen Fällen, in denen eine qua-

litative Aussage nach der Gelelektrophorese erwartet wurde. Agarosegelelektrophorese gehörte zu den schnellen Trenntechniken: Bereits nach 1h Laufzeit ließen sich die Ergebnisse ablesen.

Die Längenbestimmung definierter DNA-Fragmente oder die Partialverdauungsanalyse erfolgte in Polyacrylamidgelen. Der höhere Zeitaufwand (teilweise 12h Laufzeit) wurde durch die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Längenbestimmungen deutlich ausgeglichen.

4.1. Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch

Alle Proben für analytische oder präparative Agarose- und Polyacrylamidgele wurden mit 0,2 Volumina dieses Gemisches unter Vortexmischen versetzt und kurz zentrifugiert. Zusammensetzung: 40,0% (v/v) Glycerin
0,12 M EDTA pH=7,4
0,4% (v/v) NLS (Sarkosyl)
0,1% (w/v) Bromphenolblau
Glycerin läßt die Verdauungsansätze in die Geltaschen absinken, EDTA komplexiert alle bivalenten Kationen, Sarkosyl inhibiert sofort vollständig jegliche Enzymaktivität und Bromphenolblau macht die Elektrophorese-Lauffront sichtbar.

4.2. Agarosegelelektrophorese

Je nach der Größe der zu analysierenden Ad2 DNA-Fragmente wurden 0,8 - 1,4- oder 2%ige Agarosegele benötigt. Lange quaderförmige Gele (0,42 cm^2 Auftragsfläche, 16 cm lang) wurden in einer Plexiglasform gegossen, die aus einer planparallelen Platte mit Ausschnitt und seinem Gegenstück, das Ausfräsungen für 13 Gelquader enthielt, bestand. Im unteren Drittel der Form waren alle Vertikalfräsungen untereinander durch eine breite Querfräsung verbunden.

Nachdem eine Gelform benutzt worden war, wurden die Gelquader oberhalb dieser Querfräsung abgetrennt und aus ihren Frässchlitzen z.B. auf eine UV-Lichtplatte geschoben. Die

Gelquader ließen sich dicht aneinanderschieben, so daß Grössenvergleiche der Banden vereinfacht wurden. Die Neufüllung der Formen wurde so ebenfalls erleichtert, da das Agarosegel in der Querfräsung erhalten blieb und als Pfropf für die neu eingefüllte Gellösung diente.

Die Gelformen wurden mit je zwei großen Aktenklammern an jeder Seite zusammengehalten. Mit einer 25ml-Pipette ließen sich mehrere Gelformen hintereinander gießen.

Gel- und Laufpuffer war in allen Fällen Hayward-Puffer, pH=7,7 (Hayward, 1972). Er wurde 10fach konzentriert angesetzt und besaß folgende Zusammensetzung: 0,36 M Tris
0,30 M NaH_2PO_4
0,01 M EDTA
0,1% (w/v) NaN_3

Der glasfaserfiltrierte 10fache Hayward-Puffer wurde bei 4°C vorrätig gehalten. Sein pH=7,95 veränderte sich bei der Verdünnung 1:10 auf den gewünschten pH=7,7. Als Laufpuffer wurde er wie folgt verdünnt:

200,0 ml 10fach Hayward-Puffer
2,0 ml NaN_3-Lösung 20% (Endkonzentration: 0,03%)
0,1 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)
(Endkonzentration: 0,00005%)
H_2O bidest. ad 2000,0 ml

Die Herstellung von Agarosegelen soll am Beispiel 1,4%iger Gele beschrieben werden:
1,4 g Agarose wurden mit 90 ml H_2O bidest. auf einem Heizrührer zum Sieden gebracht und 1 min. im Sieden gehalten, um die vollständige Lösung aller Partikel zu erreichen. Nach Abkühlung im Wasserbad auf 60°C wurden 10 ml 10fach Hayward-Puffer, o,1 ml NaN_3-Lösung 20% (Endkonzentration: 0,03%) und 0,05 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) (Endkonzentration: 0,0005%) zugesetzt (Sharp et al., 1973).

Bei 55°C wurden die Gelformen luftblasenfrei gefüllt, die Erstarrung erfolgte bei RT. Danach ließen sie sich in einer befeuchteten Klarsichttüte bei 4°C aufbewahren.

Zur Vorbereitung auf die Elektrophorese wurden die Gelformen entklammert, und die planparallele Platte wurde 2 cm nach

unten geschoben. Nun konnte man 2 cm tief die Agarose aus den Frässchlitzen mit einem Spatel abstechen und verwerfen. So entstanden auf gleicher Höhe gleichmäßige Auftragsflächen. Die planparallele Platte wurde wieder nach oben geschoben, das Gelsystem geklammert und in eine Vertikalelektrophoreseapparatur nach Studier (1973) eingespannt.

Der Laufpuffer wurde im oberen Reservoir bis zur Gelkante aufgefüllt, im unteren Reservoir reichte eine Eintauchtiefe von 1 cm aus. Die Proben konnten mit einer 100 µl-Mikropipette aufgelagert werden.

Die Gele wurden mit 150 mA für 1h elektrophoretisiert.

4.3. Polyacrylamidgelsysteme

Drei verschiedene Gelsysteme sind in dieser Arbeit verwendet worden:
1. 4%-Gele mit Hayward-Puffer
2. 5%- oder 10%-Gele mit Tris-Borat-Puffer, pH=8,3
Diese beiden Systeme wurden in der Vertikal-Flachgelapparatur HSI SE 520 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) in einer Gelstärke von 1,5 mm benutzt.
3. 5%-Kompaktgele, die zwischen ausgefrästen Plexiglasplatten gegossen wurden, von 2 mm Gelstärke mit Tris-Borat-Puffer.Sie wurden in den Apparaturen nach Studier eingesetzt (s. 4.2.).

4.3.1. Polyacrylamidgele in der HSI SE 520-Elektrophoreseeinheit

Die Elektrophoreseeinheit bestand aus einem Plexiglastank, in den ein gekühlter Kern eingesetzt wurde, der an jeder Breitseite ein Gel tragen konnte.

Nach der Originalvorschrift sollten Gelformen aus zwei 0,3 cm dicken Glasplatten des Formats 32,4 cm x 18,0 cm, von denen eine einen symmetrischen Ausschnitt von 14,0 cm Länge und 2,0 cm Tiefe hatte, mit Randspacern aus grauem PVC (32,4 cm x 1,9 cm x 0,15 cm) horizontal auf den Kühlkern gelegt und leicht mit Plastikschraubklemmen am Kühlkern befestigt wer-

den. Ein mit einer Silikongummidichtung versehener Steg sollte mittels zweier Exzenterknebel gegen die Unterkante der Gelform gepreßt werden, wodurch die Gelform auch oben fest gegen zwei Haltenocken gedrückt werden sollte.

In die vertikale Position gebracht, sollte dieser Aufbau ein problemloses Gießen der Gele erlauben. In der Praxis stellte sich jedoch heraus, daß das System nicht dicht genug abschloß, auch dann nicht, wenn die Schraubklemmen fest angezogen waren und das Silikongummi mit Dichtmasse versehen wurde.

Als Problemlösung erwies sich die Verwendung von tesa-Gewebeband, mit dem freiliegende Gelformen exakt um die Glaskanten herum verklebt wurden. Nachdem das Gewebeband kräftig angerieben worden war, sorgten drei kleine Aktenklammern auf jeder Seite für den notwendigen Andruck. Die Gelformen konnten frei vertikal zum Gießen aufgestellt werden, und eine Vorratshaltung von Gelen war ebenfalls für mehrere Tage möglich, wenn die Gele in einer feuchten Kammer (Plastiktüte) bei 4°C aufbewahrt wurden.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß selbst große Sequenzgele mit diesem Verfahren abgedichtet werden konnten.

4.3.1.1. 4%-Polyacrylamidgele mit Hayward-Puffer

Der Vernetzungsgrad in diesen Gelen, d.h. das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), war 19:1. Wässrige Lösungen aus 19% rekristallisiertem Acrylamid und 1% rekrist. Bis wurden über einem Mischb ettionenaustauscher aufbewahrt und bei Bedarf glasfaserfiltriert.

Es folgt die Vorschrift für die Präparation eines Gels (80 ml):

16,0 ml Acrylamid-Bis-Lösung 19:1
8,0 ml 10fach Hayward-Puffer
55,5 ml H_2O bidest.

Diese Lösung wurde zusammen mit wenigen ml frisch hergestellter Ammoniumperoxodisulfat(APS)-Lösung 10% im Exsikkator evakuiert, bis kräftig Blasen aufstiegen. 0,4 ml APS-Lösung 10% und 0,08 ml TEMED wurden der Monomerlösung zugesetzt und durch kurzes Schwenken vermischt. Mit einer 10 ml-Pipette

wurden die Gelformen durch gleichmäßiges Einfließenlassen am Spacer entlang bis zur Ausschnittkante gefüllt.

Ein Teflonkamm für 10 Geltaschen vom Format 0,85 cm x 2,5 cm, mit 0,45 cm Zwischenraum wurde bis zur Ausschnittkante eingeschoben. Nach ca. 10 min. setzte die Polymerisation ein, die nach 45 min. völlig abgeschlossen war. Die Gele konnten gleich nach der Polymerisation benutzt werden.

Nachdem der Kamm vorsichtig entfernt worden war, wurden die Geltaschen vom Geldebris mit einem Spatel und durch Spülen mit 1fach Hayward-Puffer befreit, und das tesa-Gewebeband entfernt. Die Gelformen hielten durch die hervorragende Adhäsion des Polyacrylamids zum Glas und PVC (keine Lückenbildung!) auch ohne Klammerung zusammen, sie wurden in horizontaler Lage auf den Kühlkern geklammert und in den Elektrophoresetank gesetzt.

Hayward-Puffer wurde bis 2 cm über die untere Gelkante in den Tank und in das obere Pufferreservoir im Kühlkern bis zur oberen Glaskante eingefüllt. Ein Deckel mit Bohrungen für die Kühlwasserstutzen aus dem Kühlkern und Elektrodenzuführungen verschloß die Apperatur. Der Kühlkern wurde mittels eines Haake K-Wasserbades mit Haake F3-Regelelektronik auf 20°C thermostatisiert. Die Proben wurden mit einer 20 µl-Mikropipette aufgelagert.

Die Gele wurden mit 100 V konst. (≙ 3,3 V/cm) für 11 - 12h elektrophoretisiert. Danach befand sich die Bromphenolblau--Front, die die gleiche Mobilität wie DNA-Fragmente von 20 - 25 Nukleotidpaaren hatte, 6 - 7 cm über der unteren Glaskante.

Nach der Abnahme der Gele vom Kühlkern wurden die Glasplatten getrocknet, die Spacer seitlich nach unten herausgezogen und eine der Glasplatten mit Hilfe eines Spatels vom Gel abgehebelt. Die Gele wurden entweder ethidiumbromidgefärbt (s. 4.1.1. oder für die Autoradiographie (s. 4.4.2.) vorbereitet.

4.3.1.2. 5%- und 10%-Polyacrylamidgele mit Tris-Borat-Puffer

Polyacrylamidgele mit pH=8,3 sind von Peacock und Dingman (1967) beschrieben worden und erschienen geeignet, DNA-Fragmente so effektiv voneinander zu trennen, daß sie in einer

modifizierten Version auch als Sequenzgele eingesetzt werden konnten (Maniatis et al., 1975).

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele zur analytischen Trennung waren 29,41:1 vernetzt. Die Acrylamid-Bis-Stammlösung wurde 20%ig angesetzt. Wäßrige Lösungen aus 19,342% Acrylamid und 0,658% Bis wurden über einem Mischb ettionenaustauscher aufbewahrt und bei Bedarf glasfaserfiltriert.

Der Tris-Borat-(TB)-Puffer, pH=8,3, enthielt 5o mM Tris und 1 mM EDTA. Er wurde 10fach konzentriert angesetzt und mit krist. Borsäure auf pH=8,3 eingestellt. Glasfaserfiltriert und autoklaviert wurde er bei RT in Glasflaschen aufbewahrt.

Zur Herstellung eines 5%-Gels (80 ml) wurden folgende Mengen benötigt: 20,0 ml Acrylamid-Bis-Lösung (29,41:1)
8,0 ml 10fach TB-Puffer
51,5 ml H_2O bidest.
Für ein 10%-Gel waren die Volumina entsprechend zu verändern:
40,0 ml Acrylamid-Bis-Lösung (29,41:1)
8,0 ml 10fach TB-Puffer
31,5 ml H_2O bidest.
Die Zusätze an APS-Lösung 10% und TEMED, die Gießprozedur und der Aufbau der Apparatur entsprachen der Vorschrift für 4%--Polyacrylamid-Hayward-Gele (s. 4.3.1.1.).

Die Gele wurden mit 200 V konst. (≙ 6,6 V/cm) in 1fach TB--puffer für 12h elektrophoretisiert. Danach befand sich die Bromphenolblau-Front knapp über der unteren Gelkante.

4.3.2. 5%-Kompaktgele mit Tris-Borat-Puffer

Nach der präparativen singulären Restriktion von doppelsträngig 5'-^{32}P-endmarkierten Fragmenten sollte die Vollständigkeit der Verdauung und die Integrität der Fragmente möglichst schnell vor der Auflagerung auf präparative Gele überprüfbar sein.

In gefrästen Plexiglasformen von 18 cm x 18 cm x 1,2 cm mit 20 Gelschlitzen von 3 cm Länge und 0,6 cm Breite, die am unteren Ende 1,5 cm tiefe entsprechende Gelschlitze besaßen und die mit einer 1 cm dicken Plexiglasplatte, die einen 1 cm tie-

fen symmetrischen Ausschnitt besaß, abgedeckt wurden, konnten für diesen Zweck 5%-Gele von 2 mm Stärke gegossen werden. Die Formen wurden ebenfalls mit tesa-Gewebeband abgedichtet und brauchten nicht geklammert zu werden.

Zur Herstellung eines 5%-Kompaktgels (60 ml) wurden folgende Volumina zusammengegeben:

15,0 ml Acrylamid-Bis-Lösung (29,41:1)
6,0 ml 10fach TB-Puffer
38,6 ml H_2O bidest.

Die evakuierte Lösung wurde mit 0,3 ml evakuierter APS-Lösung 10% und 0,06 ml TEMED versetzt und bis 0,5 cm unter die Ausschnittkante in die Gelform eingefüllt. In jeden Gelschlitz wurden vorsichtig 100 µl H_2O bidest. pipettiert.

Nach der Polymerisation wurde das Wasser herausgeschüttelt und die Formen wurden an einer Elektrophoreseapparatur nach Studier (s. 4.2.) angebracht. In 1fach TB-Puffer pH=8,3 wurden Aliquots der präparativen Verdauungen mit ØX 174 HaeIII- oder pBR 322 HpaII-Markerfragmenten bei 250 V (≙ 15,6 V/cm) für 1 - 1,5h elektrophoretisiert.

Nach einer autoradiographischen Exposition von ca. 1h konnten die Resultate der präparativen Verdauung abgelesen werden.

4.4. Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente

Das bereits bei der Gießprozedur in das Agarosegel inkorporierte Ethidiumbromid ließ den Nachweis von DNA-Banden im UV sofort nach der Elektrophorese zu.

Auf Polyacrylamidgelen wurden vorwiegend 5'-^{32}P-endmarkierte DNA-Fragmente getrennt, deren Banden durch Autoradiographie nachgewiesen wurden. Bei der physikalischen Kartierung von Subfragmenten des EcoRI B-Fragments lagen unmarkierte und endmarkierte DNA-Banden oft in einem Gel vor. Es war möglich, unmarkierte DNA-Fragmente zunächst durch Ethidiumbromidfärbung und danach die endmarkierten DNA-Fragmente autoradiographisch nachzuweisen.

4.4.1. Ethidiumbromidfärbung von Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele wurden erst nach der Elektrophorese ethidiumbromidgefärbt. Dazu wurden sie 30 - 60 min. auf einer Glasplatte unter Lichtabschluß in 1 - 2 l folgenden Puffers eingelegt: 5o mM Tris-HCl pH=8,0
1 mM EDTA pH=7,4
1 µg/ml Ethidiumbromid.

4.4.2. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen

Nach der Abnahme der Gele von der HSI SE 520-Elektrophoreseeinheit (s. 4.3.1.1.) wurden die Gelplatten getrocknet, die Spacer unten seitlich herausgezogen und die Deckglasplatte abgehebelt. Die Glasränder wurden mit Fließpapier gänzlich von Puffer befreit und die Geltaschenstege entfernt. Das Gel wurde luftblasenfrei mit Frapan-Haushaltsfolie überzogen, die Folie wurde fest auf der Glasrückseite angelegt. Oben, unten und an einer Seite wurden kurze überlappende Gewebebandstücke auf die Glasunterseite geklebt.

Im Falle von präparativen Gelen wurde an den Eckpunkten und entlang einer Seite des Gels punktförmig radioaktive Tinte, die aus $[\gamma\text{-}^{32}P]$-ATP in Tipp-Ex^{r}flüssig hergestellt worden war, aufgetragen. Nach dem Abtrocknen der Tintenflecke wurden sie mit Tesafilm überklebt.

In der Dunkelkammer wurde Kodak X-Omat R- oder Kodak XR 5--Röntgenfilm linksbündig auf das Gel gelegt, mit einer Deckglasplatte abgedeckt und die Gewebebandstücke unter Zug auf der Deckglasplatte befestigt. In einer lichtdichten Box aus grauem PVC mit mehreren Einschubböden wurde die Exposition vorgenommen. Für präparative Gele wurde 10 min. - 1h, für analytische Gele 24h und länger exponiert.

Die Röntgenfilme wurden in großen Tanks durch Einhängen der Filmrahmen handentwickelt. Nach 10minütiger Entwicklung in Kodak LX24-Röntgenentwickler unter anfänglicher Agitation wurde 1 min. zwischengewässert, 1 min. in einem 5% Essigsäurebad, das Entwicklerreste gänzlich entfernte und das Fixierbad

schonte, geschwenkt und wieder 1 min. zwischengewässert. Schließlich wurde 10 min. unter zeitweiligem Schwenken in Kodak AL4-Röntgenfixierbad fixiert.

Die Filme wurden unter fließendem Leitungswasser erschöpfend gewässert, mit vollentsalztem Wasser abgespült und bei RT an der Luft getrocknet.

Diese Entwicklungsprozedur galt ebenso für Sequenzgelautoradiographien (s. V.3.5.).

4.4.3. Auswertung von analytischen Polyacrylamidgelen

Wie bereits in den Tabellen 3 und 4 dargestellt, dienten HaeIII-Fragmente von ØX 174 RFI DNA und HpaII-Fragmente von pBR 322 DNA als Eichfragmente bei der analytischen Polyacrylamidgelelektrophorese. Diese Marker wurden in den Geltaschen neben den zu bestimmenden Proben aufgelagert oder in einigen Fällen mit den zu bestimmenden Proben coelektrophoretisiert.

Alle Auswertungen beruhten auf dem Prinzip, im linearen Bereich des Gellaufs die dekadischen Logarithmen der Fragmentgrößen in bp den ermittelten Migrationsweiten in cm zuzuordnen, sei es in einem Diagramm, sei es durch Berechnung der linaren Regression.

Ethidiumbromidgefärbte Gele (s. 4.4.1.) wurden entweder mit Frapanfolie überzogen, Bandenfluoreszenzen im kurzwelligen UV direkt ausgemessen und ihre Position auf der Frapanfolie markiert oder mit einer Polaroid MP4 Land Kamera auf Polaroid 4x5 Type 55 Landfilm im kurzwelligen UV unter Verwendung eines Kodak Wratten Gelatinefilters Nr. 23a fotographiert. Die Bandendistanzen wurden anschließend auf dem Foto vermessen.

Präparative Polyacrylamidgele und Agarosegele wurden ebenfalls mit dieser Ausrüstung fotographiert.

Die Migrationsweiten auf Autoradiogrammen wurden entweder direkt vermessen, wobei die Distanz im Schwärzungsmaximum einer Bande abgelesen wurde, oder es konnten mit dem Chromatogramm--Spektralphotometer KM3 (Zeiss, Oberkochen) Ortskurven der Banden durch Absorptionsmessung in Transmission bei 500 nm aufgenommen werden. Für die freundliche Hilfe bei diesen Messun-

gen danke ich dem Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie an der Ruhr-Universität Bochum.

Zumeist ging eine Bewertung der halblogarithmischen Standardkurve im Diagramm einer Auswertung durch Berechnung der linearen Regression voraus. Als Beispiel diene die Größenbestimmung (in bp) der HpaII-Subfragmente des Ad2 DNA-Fragments BglII J/HinfI-1 in einem ethidiumbromidgefärbten 5%-Polyacrylamidgel. 17 der 21 HpaII-Fragmente von pBR 322 DNA waren zu detektieren. Im Diagramm war die Standardkurve in allen Punkten linear (Abb. 2).

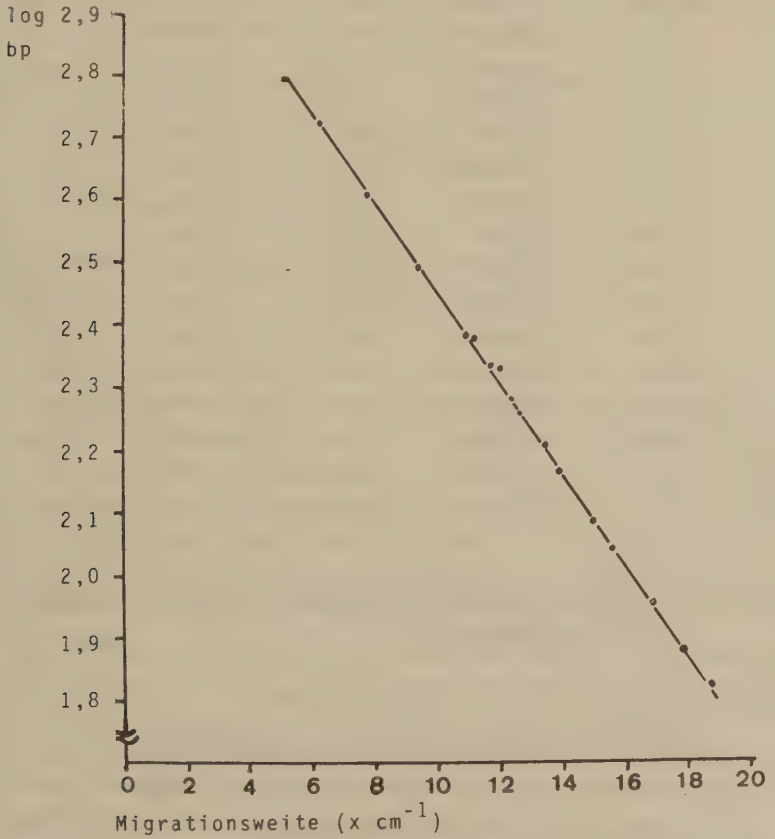


Abb. 2: Halblogarithmische Standardkurve von pBR 322 DNA--HpaII-Fragmenten
Elektrophorese: 5%-Polyacrylamidgel in TB-Puffer, pH=8,3

In einer Tabelle wurden die Migrationsweiten der Markerfragmente (x-Werte) den dekadischen Logarithmen der Basenpaargröße (y-Werte) zugeordnet, und die lineare Regression durch ein taschenrechnerinternes Programm (TI-51-III von Texas Instruments) berechnet (Tabelle 6).

Fragment-nr.	Migrationsweiten (cm)	log bp	Tabellenwert (bp)	bp nach Regressionsgerade	Δbp
1	5,17	2,79379	622	624	+2
2	6,25	2,72181	527	521	-6
3	7,77	2,60638	404	404	0
4	9,33	2,48996	309	312	+3
5	10,80	2,38381	242	244	+2
6	11,05	2,37658	238	234	-4
7	11,53	2,33646	217	216	-1
8	12,05	2,30319	201	198	-3
9	12,30	2,27875	190	190	0
10	12,60	2,25527	180	181	+1
11	13,35	2,20412	160	160	0
12	13,80	2,16732	147	148	+1
13	14,85	2,08636	122	124	+2
14	15,47	2,04139	110	112	+2
15	16,80	1,95424	90	90	0
16	17,83	1,88081	76	76	0
17	18,67	1,82607	67	66	-1

Tabelle 6: Parameter zur Berechnung der linearen Regression von Markerfragmenten

Die Regressionsgrade besaß folgende Werte:

Korrelationskoeffizient r = -0,9998502

Geradensteigung (log tan α) = -0,0723608

Ordinatenschnittpunkt = 3,169094

Die Geradengleichung lautete demnach:

$$y' = -0,0723608x + 3,169094$$

Wurden die Migrationsweiten in cm (x-Werte) wieder in diese Geradengleichung eingesetzt, konnten y'-Werte (log bp) und danach die bp-Größen rückgerechnet werden, deren Differenz zu den Tabellenwerten ausgedrückt wurde (Δbp). So konnte die Abbildungsgüte der Regressionsgrade überprüft werden.

Die Migrationsweiten für das unverdaute BglII J/HinfI-1-Fragment (4,63 cm) und für dessen drei HpaII-Subfragmente (6,4 cm; 12,1 cm und 17,2 cm) wurden nun ebenfalls in die Geradengleichung eingesetzt und ihre bp-Größen errechnet:

BglII J/HinfI-1 : 682 bp

BglII J/HinfI-1/HpaII-1 : 508 bp

BglII J/HinfI-1/HpaII-2 : 196 bp

BglII J/HinfI-1/HpaII-3 : 84 bp

Das Resultat für BglII J/HinfI-1 war unkorrekt, da die Standardkurve in diesem Gelbereich nicht mehr linear verlaufen war.

Die ermittelten Subfragmentgrößen wurden nun noch um die Differenzen korrigiert, die zwischen den Tabellen- und Rechnungswerten bestanden: das BglII J/HinfI-1/HpaII-1-Fragment z.B. lag größenordnungsmäßig zwischen dem 2. und 3. Markerfragment, zwischen denen ein "Abstand" von 123 Nukleotiden mit Δbp = -6 bestand. Vom 3. Markerfragment zum BglII J/HinfI-1/HpaII-1-Fragment bestand ein "Abstand" von 104 Nukleotiden mit einem ins Verhältnis dazu gesetzten Δbp = -5.

Die korrigierte Größe für dieses Subfragment war demnach 508 + 5 bp = 513 bp. Die korrigierten Werte für die beiden weiteren Subfragmente waren 196 + 2 bp = 198 bp und 84 + 0 bp = 84 bp. Die Summe der Subfragmente betrug also 795 bp. Die Größe des BglII J/HinfI-1-Fragments war in einer vorhergehenden Auswertung mit 805 bp bestimmt worden.

Es konnte mit dieser Methode aber nicht festgestellt werden, ob hier noch Ungenauigkeiten der Bestimmungen auf Grund von unterschiedlichen Gelläufen vorlagen oder ob ein ca. 10 bp

großes Subfragment nicht im Gel detektiert worden war. Aufschlüsse über basengenaue Fragmentgrößen konnten erst nach der Sequenzanalyse erhalten werden.

III. Präparation von DNA-Fragmenten

Im allgemeinen ging die Isolation viraler DNA-Subfragmente vom EcoRI B-Fragment aus, das selbst nach EcoRI-Restriktion von Ad2 DNA oder nach seiner Klonierung aus pBR 322 gewonnen und aus Agarosegelen isoliert worden war.

Die für die 5'-^{32}P-Endmarkierung vorgesehenen EcoRI B-Subfragmente wurden aus Agarose- oder Polyacrylamidgelen wiedergewonnen, endmarkiert und nach einem asymmetrischen Schnitt mit einer weiteren Endonuklease auf Polyacrylamidgelen getrennt und wiedergewonnen.

1. Restriktion unmarkierter DNA-Fragmente für die präparative Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese

Hierbei wurde das Volumen des Ansatzes so groß gewählt, daß die nachfolgende Proteolyse (s. 3.1.) und die Phenolätherextraktion (s. 3.2.) in geeigneten Volumina ablaufen können.

Als Beispiel sei die Verdauung von 20 µg EcoRI B/BglII C-Fragment mit BalI aufgeführt:
Es lagen 47,5 µg EcoRI B/BglII C-Fragment in 1 ml TE-Puffer vor. Verdauungsansatz: 120 µl 10fach BalI/BglII-Puffer
653 µl H_2O bidest.
6 µl 1M DTT
421 µl EcoRI B/BglII C-Fragment
Σ= 1200 µl
\+ 300 µl BalI

Nach einer Inkubation von 1,5h bei 37°C wurde eine Aliquot von 50 µl für ein analytisches Agarosegel abgenommen, der Rest wurde der Proteolyse unterworfen.

Präparative Verdauungen von ØX 174 RFI DNA mit HaeIII oder von pBR 322 DNA mit HpaII dienten nicht der präparativen Auftren-

nung in Gelsystemen, sondern der Bereitstellung von Standard-Aliquots für die Längenbestimmung in analytischen Polyacrylamidgelen. Als Beispiel diene die Verdauung von pBR 322 DNA mit HpaII:

Es lagen 3 mg pBR 322 DNA/ml vor. 400 µg DNA sollten verdaut werden.

Verdauungsansatz:

40 µl	10fach BalI/BglII-Puffer
45 µl	H_2O bidest.
2 µl	1M DTT
80 µl	BSA 500 µg/ml
133 µl	pBR 322 DNA-Lsg
∑= 300 µl	
+ 100 µl	HpaII-Lsg

Hierbei sind die 100 µl Enzymlsg. bereits in das Gesamtvolumen von 400 µl mit einbezogen. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wurden 10 µl ≙ 10 µg DNA abgenommen, mit 2 µl Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch gemischt und auf einem 5% Polyacrylamid-Kompaktgel (s. II.4.3.2.) elektrophoretisiert.

Nach Ethidiumbromidfärbung waren 19 der 21 HpaII-Banden ohne Partialprodukte deutlich zu erkennen. Die Verdauung wurde der Proteolyse und Phenolätherextraktion unterworfen und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf konnten jeweils 10 µl DNA als Längenstandard eingesetzt werden.

2. Restriktion 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente für die präparative Polyacrylamidgelelektrophorese

Diese Verdauungen wurden zumeist in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, wenn die Proben vor der Auflagerung auf Polyacrylamidgele nicht weiter gereinigt wurden.

Als Beispiel diene die Verdauung des BglII J/AluI-(3+4)-Fragments mit HpaII. Die additive Nummerierung der AluI-Subfragmente in der Klammer bedeutet, daß in dieser Präparation zwei AluI-Subfragmente vorliegen, die bei der Gelelektrophorese auf Grund annähernd gleicher Größe nicht trennbar waren, die gemeinsam wiedergewonnen und auch beide in einem Ansatz doppelsträngig 5'-endmarkiert wurden. Ihre Positionen innerhalb dieser AluI-Subfragmente waren vorab ermittelt worden.

Nach HpaII-Verdauung entstanden so vier einzelsträngig 5'-endmarkierte Fragmente unterschiedlicher Größe, die in der präparativen Geleletrophorese voneinander getrennt werden konnten und nach Reinigung für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert zur Verfügung standen.

Nach der 5'-Endmarkierung lag die Probe als Präzipitat vor, sie wurde in 32,5 µl sterilem H_2O bidest. durch Inkubation bei 65°C für 10 min. aufgelöst.

Verdauungsansatz:

5,0 µl	BalI/BglII-Puffer
32,5 µl	BglII J/AluI-(3+4)-Fragmente ($\hat{=}$ 3,7 x 10^6 cpm)
2,5 µl	0,1M DTT
10,0 µl	BSA 500 µg/ml
$\sum$= 50,0 µl	
+ 4,0 µl	HpaII-Lsg.

Nach einer Inkubation von 2h bei 37°C wurde der Ansatz mit 11 µl Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch gemischt, zur Denaturierung der DNA-assoziierten Proteine, die das Eindringen der Fragmente in die Gelmatrix verhindern würden, 10 min. bei 65°C erhitzt, kurz bei 4°C zentrifugiert und auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgelagert. In anderen Fällen wurde vor der Auflagerung auf das Gel noch eine Reinigung eingeschaltet.

3. Reinigungsmethoden

Die für die präparative Gelelektrophorese vorgesehenen unmarkierten DNA-Fragmente wurden mit den klassischen Methoden der Proteolyse und Phenolätherextraktion von Proteinkontaminanten befreit, die aus der Endonukleaseverdauung stammten.

Auch 5'-^{32}P-endmarkierte DNA-Fragmente, von denen zumeist nur wenige µg vorlagen, mußten vor der präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt werden, da andernfalls die Poren der Gelmatrix schon am Start mit DNA-Proteinkomplexen verstopft wurden, wodurch starke Verluste an Radioaktivität in den isolierten Fragmenten zu verzeichnen waren.

3.1. Proteolyse

Unter der Einwirkung von Proteinase K und SDS wurden alle die präparative Elektrophorese störenden Proteine, insbesondere die DNA-assoziierten Proteine, denaturiert und in sehr kleine Bruchstücke gespalten, die bei der anschließenden Phenolätherextraktion aus der Probe entfernt werden konnten.

Dazu wurde der Verdauungsansatz mit 0,11 Volumina 0,2 M EDTA pH=7,4, 0,005 Volumina SDS 20% in H_2O bidest. (Endkonzentration: 0,1%) und 0,001 Volumina Proteinase K (25 mg/ml) versetzt, gemischt und 30 min. bei 50°C inkubiert.

3.2. Phenolätherextraktion

Die Extraktion konnte in 9- oder 16 ml-Röhrchen, aber auch in Eppendorf-Hütchen unter Vortexbenutzung, dann aber nur mit Fragmenten von 50 - 2000 bp Größe, durchgeführt werden. Die Volumenangaben des nachfolgenden Protokolls beziehen sich, wenn nichts anderes angeben wird, auf das Ausgangsvolumen der Probe.

Mit Phenolgemisch wurde folgende Lösung bezeichnet: Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 50:50:1. Für die Zentrifugationen bei 4°C für 10 min. mit 1500 xg wurden die Zentrifugen Sigma 3K1 (Sigma GmbH) und Minifuge (Heraeus Christ) benutzt, wenn nichts anderes angegeben ist.

1,5 Volumina Phenolgemisch wurden mit 0,25 Volumina 1M Tris-HCl pH=8,0 durch Schütteln abgesättigt, und überschüssiger Puffer wurde abgehebert. 1 Volumen Phenolgemisch wurde zur Probe gegeben und die Probe 30 min. bei 4°C auf einer 60° geneigten rotierenden Scheibe extrahiert. Dann wurde zentrifugiert, die wässerige Phase abgehebert, ohne die Interphase zu berühren, und in ein neues Röhrchen transferiert.

Mit 0,5 Volumina H_2O bidest. wurde die Phenolphase durch Rotation für 5 min. bei 4°C reextrahiert, zentrifugiert und die wässerige Phase zu dem ersten wässerigen Überstand gegeben. Diese vereinigten wässerigen Überstände wurden mit

0,5 Volumina Phenolgemisch erneut durch Rotation (15 min., 4°C) extrahiert. Nach der Zentrifugation durfte keine Interphase mehr sichtbar sein. Die wässerigen Phasen wurden wieder abgehebert, und die Phenolphase wurde nochmals mit 0,5 Volumina H_2O bidest. reextrahiert.

Alle wässerigen Phasen wurden nun vereinigt, und das neue Gesamtvolumen wurde bestimmt. Zur Entfernung des restlichen Phenols wurde der wässerige Überstand mit 0,5 Volumina Diäthyläther (bezogen auf das neue Gesamtvolumen) geschüttelt und die obere Ätherphase verworfen. Diese Extraktion wurde so oft wiederholt, bis jegliche Trübung verschwunden war.

Die DNA wurde entweder nach Zugabe von 0,1 Volumen 3M Natriumacetat mit 2,5 Volumina -20°C Äthanol 96% oder nach Zugabe von 0,1 Volumen 2,5M KCl mit 2,5 Volumina Isopropanol gefällt. Nach -20°-Fällung über Nacht wurde 30 min. mit 72000xg im SW 27 Rotor in der Ultrazentrifuge L5-75 (Beckman Instruments, München) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dann mit Äthanol 70%-0,3 M Natriumacetat, Äthanol 96% und Diäthyläther gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschritt eine Zentrifugation von 5 min. bei 1500xg lag. Das Präzipitat konnte an der Luft trocknen, aber auch im Exsikkator getrocknet werden.

3.3. Präparation 5'-^{32}P-endmarkierter DNA-Fragmente nach singulärer Restriktion vor der präparativen Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit einer Ammoniumacetatfällung wurde erreicht, daß sehr wenig radioaktives Material am Start des Polyacrylamidgels liegenblieb:
Zu 50 µl Verdauungsansatz wurden
10 µl o,2M EDTA pH=7,4,
200 µl 3M Ammoniumacetat,
10 µl E.coli t RNA (1mg/ml) und
750 µl -20°C Äthanol 96%
pipettiert. Nach Mischen wurde die Probe 1h bei -20°C gehalten und 5 min. in der Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C mit 9900xg zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 250 µl 0,3 M

Natriumacetat aufgenommen, wieder mit 750 µl -20°C Äthanol 96% gefällt, nach der Zentrifugation mit 1 ml Äthanol 96% und 1 ml Diäthyläther gewaschen und in 100 µl H_2O bidest. steril gelöst.

Nach der Zugabe von 25 µl Bromphenolblau-Glycerin-Gemisch (s. II.4.1.) wurde 10 min. bei 65°C erhitzt, kurz zentrifugiert und das Polyacrylamidgel beladen.

4. Präparative Gelelektrophoresen

Die präparativen unterschieden sich von den analytischen Gelelektrophoresen in der Verwendung teilweise anderer Gelformen, anderer Geltaschenkämme und in den Gellaufparametern. Die Gelherstellung und die Durchführung der Elektrophorese verlief wie bei den analytischen Gelen.

4.1. Agarosegelelektrophorese

Es wurden verschraubbare Gelformen aus Plexiglas benutzt, in denen Plattengele von 15 cm x 14,5 cm x 0,5 cm gegossen werden konnten. Zum Gießen wurden die Formen mit dem die Auftragsfläche bildenden Spacer versehen, um 180° gedreht und auf große Aktenklammern gesetzt. Die Gellösung ließ man am Rande luftblasenfrei einlaufen (100 ml-Vollpipette), bis sie, einen Meniskus bildend, die Form gefüllt hatte.

Präparative Gele ließen sich mit einer sterilen 1 ml-Plastikpipette beladen. Sie wurden über Nacht (15h) mit 75 mA unter Umwälzung des Elektrodenpuffers elektrophoretisiert.

4.2. Polyacrylamidgelelektrophorese in der HSI SE 520-Elektrophoreseeinheit

Auch präparativ wurden 4%-Gele mit Hayward-Puffer bzw. 5%- oder 10%-Gele mit Tris-Borat-Puffer, pH=8,3, verwendet.

Nachdem die Gellösung in die Form eingefüllt worden war, wurde ein Kamm aus grauem PVC, der eine Geltasche von 13,65 cm Länge und 2,5 cm Tiefe formte, bis zur Ausschnittkante eingeschoben.

Nach dem Gießen wurden präparative Gele oft 1 Tag gealtert.

Bevor die Proben mit einer 250 µl-Hamiltonspritze als konzentrierte Bande aufgelagert wurden, mußten die Gele 45 - 60 min. präelektrophoretisiert werden, um freie Acrylsäure aus den Gelen zu entfernen. Je nach der Länge der zu trennenden DNA-Fragmente wurde mit 200 V konst. für 5 - 12h elektrophoretisiert.

5. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten

5.1. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen

Die durch ihre Ethidiumbromid-Fluoreszenz im Gel detektierten DNA-Banden wurden ausgeschnitten und in zuvor gewogene 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Nach der Gewichtsbestimmung der Gelstreifen wurde 1 ml Auflösungspuffer/g Gel zugesezt. Auflösungspuffer war: 8,0 M Natriumperchlorat
0,2 mM EDTA
10,0 mM Tris-HCl pH=7,4
Das Gel wurde über Nacht bei 37°C oder für eine kürzere Zeit bei 50°C aufgelöst. Es mußte auf vollständige Lösung geachtet werden.

Pro mg DNA sollten 8 ml Hydroxylapatit-1:1-Suspension (Bio-Gel HTP, DNA-grade von Bio-Rad) zugesetzt werden. Da die DNA-Mengen aber zumeist unter 100 µg lagen, wurde 1 ml Suspension zugegeben. Die DNA wurde durch Rotation des Röhrchens auf einer 60° geneigten Scheibe für 20 min. bei RT an das Hydroxylapatit adsorbiert.

Nach einer Zentrifugation mit 1500xg bei RT schlossen sich drei Waschschritte an: Zunächst mit 5 ml (10faches Präzipitatvolumen) 2,66 M Natriumperchloratpuffer (Auflösungspuffer 1:3 verdünnt), dann 2 x mit 5 ml 10 mM Tris-HCl pH=7,4. Die Präzipitate wurden dann 2 x mit 2,5 ml (5faches Präzipitatvolumen) und 2 x mit 2,0 ml (4faches Präzipitatvolumen) 0,6 M Kaliumphosphatpuffer pH=7,5 durch Mischen und Zentrifugieren eluiert. Die erste Elution wurde für 10 min. bei RT

auf der rotierenden Scheibe vorgenommen.

Die Eluate wurden vereinigt und endzentrifugiert bei 2500xg (20 min., RT). Die Oberstände wurden in 50 ml-Röhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol geschüttelt und bei 600xg für 7 min. zentrifugiert. Die Oberphase wurde bis zur Interphase abgehoben, in der Interphase schwamm die verknäuelte DNA. Die Isopropanolfällung wurde so oft wiederholt, bis das Volumen des Eluats sich um das 8fache verringert hatte. Das war zumeist nach der vierten Fällung der Fall.

Die DNA wurde mit einer zugeschmolzenen Kapillare aus der Interphase genommen. Wenn ein DNA-Film in der Interphase verblieb, wurde so lange erneut mit Isopropanol gefällt, bis sämtliche DNA herausgefischt werden konnte. Die DNA wurde in einem Eppendorf-Hütchen mit 1 ml Isopropanol 50%-0,25 M KCl gewaschen, und das Präzipitat war nach der Zentrifugation bei 4°C haltbar.

Um wiedergewonnene Fragmente weiter restringieren zu können, wurden evtl. störende Agaroserückstände in einigen Fällen mit einer n-Butanolextraktion beseitigt. Dazu wurden die DNA--Präzipitate in 0,5 ml TE-Puffer (s. II.3.1.) gelöst, 0,25 ml n-Butanol zugesetzt und gut gemischt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation in der Eppendorf-Mikrozentrifuge war bei Anwesenheit von Agaroserückständen ein Agarosepräzipitat vorhanden, es folgte die wäßrige Phase, darüber die n-Butanolphase. Diese wurde abgehoben und verworfen und die wäßrige Phase vorsichtig vom Agarosepräzipitat abgehoben. Die DNA in der wäßrigen Phase wurde dann erneut gefällt und gewaschen.

5.2. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus präparativen Polyacrylamidgelen

Diese Prozedur ist eine Modifikation der von Maxam und Gilbert (1980) beschriebenen Elutionsmethode.

Ethidiumbromidgefärbte DNA-Banden konnten durch ihre Fluoreszenz im langwelligen UV detektiert, markiert und mit einer Rasierklinge ausgeschnitten werden. Bei der Isolierung von 5'-endmarkierten Fragmenten wurde das Autoradiogramm des Gels,

das durch die [γ-^{32}P]-ATP-Tintenflecke (s. II.4.4.2.) dort geschwärzt worden war, mit dieser Schwärzung deckungsgleich auf die weißen Tintenflecke des Gels gelegt und fixiert. Die radioaktiven Banden wurden konservativ, d.h. mit ausreichendem Abstand zu der Filmschwärzung, durch den Film und die Frapanfolie hindurch mit der Rasierklinge ausgeschnitten.

Die Gelstreifen wurden in zuvor gewogene dickwandige SW 27 Zentrifugenbecher (Beckman Instruments, München), die mit einer 1%igen wäßrigen Lösung des Silicon-Imprägniermittels für Gläser (Roth No. 0850) silikonisiert worden waren, überführt und ihre Gewichte bestimmt. Mit einem abgerundeten Glasstab (5 mm Ø) wurde der Gelstreifen zu einem feinen Brei zerrieben und 2 ml Elutionspuffer/g Gelbrei zugesetzt. Der Elutionspuffer hatte folgende Zusammensetzung:

500,0 mM Ammoniumacetat
10,0 mM Magnesiumacetat
1,0 mM EDTA pH=7,4
0,1 % (w/v) SDS

Der Zentrifugenbecher wurde mit 2 Lagen Parafilm verschlossen und derGelbrei mit dem Elutionspuffer innig vermischt.

Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C (Brutraum) wurde 10 min. mit 3900xg (Minifuge) zentrifugiert, die Überstände wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette abgenommen und in silikonisierte Pasteurpipetten gegeben, die 1 cm hoch dicht mit silikonisierter Glaswolle gestopft waren. Pasteurpipetten und Glaswolle waren mit einer 1%igen Lösung von Dimethyldichlorosilan in Tetrachlormethan silikonisiert worden. Das Filtrat wurde in dünnwandigen SW 27 Zentrifugenbechern aufgefangen.

Zur Resuspension des Pellets waren 1 ml Elutionspuffer/g Gelbrei erforderlich. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min. mit 3900xg und Filtration wurde das Volumen der Filtrate bestimmt und 3 Volumina -20°C Äthanol 96% zugesetzt. Nach Invertieren der Probe stellte man sie 1h in ein Äthanol-Eisbad. In der Ultrazentrifuge L5-75 (Beckman Instruments, München) wurde die DNA mit 72000xg in 30 min. bei 4°C präzipitiert.

Das Präzipitat war dann in 0,3 ml o,3 M Natriumacetat lös-

lich, die Lösung wurde in silikonisierte Eppendorf-Hütchen überführt, der Zentrifugenbecher mit 0,1 ml 0,3 M Natriumacetat gespült und die 0,4 ml Lösung mit 1 ml -20°C Äthanol 96% bei -20°C im Äthanol-Eisbad für 30 min. oder im -80°C Äthanol-Trockeneisbad für 5 min. gefällt. Danach wurde in der Eppendorf Mikrozentrifuge 5 min. mit 9900xg bei 4°C zentrifugiert und das Präzipitat mit je 1 ml Äthanol 70%--0,3 M Natriumacetat, -20°C Äthanol 96% und Diäthyläther gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Probe invertiert und jeweils 5 min. zentrifugiert.

Es resultierte ein gelblich-weißes Präzipitat, das noch im Exsikkator getrocknet wurde. Im Falle von 5'-endmarkierten Fragmenten wurde der Erfolg der Wiedergewinnung und die Wiedergewinnungsrate durch Cerenkov-Messungen (s. II.3.3.) kontrolliert.

IV. 5'-^{32}P-Endmarkierung doppelsträngiger DNA-Fragmente

1. Entfernung von 5'-Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus E.coli (BAP) oder aus dem Kalbsdarm (CAP) wurde zur Dephosphorylierung verwendet. 1 Einheit Alkalische Phosphatase dephosphorylierte 50 - 100 pMol 5'-OH--Enden. Wenn einzelne Subfragmente dephosphoryliert wurden, wurden die entstehenden pMol 5'-OH-Enden wie folgt berechnet:

$$\text{pMol 5'-OH-Enden} = \frac{1000}{\text{bp}} \times 3{,}2 \times \mu\text{g DNA}$$

Bei den Dephosphorylierungen von pBR 322-HpaII-Fragmenten oder ØX 174-HaeIII-Fragmenten mußte die Anzahl der Fragmente in die Formel einbezogen werden:

$$\text{pMol 5'-OH-Enden} = \frac{1000}{\text{bp}} \times 3{,}2 \times \mu\text{g DNA} \times \text{Anzahl der Fragmente}$$

Im allgemeinen wurde nach folgender Prozedur verfahren: Die Fragmente lagen zumeist als Präzipitate nach Isopropanolfällung vor. Sie wurden mit 1 ml Isopropanol 70%-0,3 M Natriumacetat gewaschen, 2 min. zentrifugiert, nochmals mit

1 ml Isopropanol gewaschen, zentrifugiert und mit 1 ml Diäthyläther versetzt. Der Diäthyläther wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen und das Pellet trocknete 15 min. bei RT. Dann wurde es in 45 µl TE-Puffer mit 5 µl 10fach BglII-Puffer aufgenommen.

Die erforderlichen µl Alkalische Phosphatase in Ammoniumsulfatsuspension wurden entnommen und in einem 0,5 ml Eppendorf-Mikrotube 2 min. bei 4°C zentrifugiert. Mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette wurde der Überstand entfernt, die Alkalische Phosphatase in 5 µl 1fach BglII-Puffer aufgenommen und zu der Fragmentlösung gegeben. Für DNA-Fragmente mit 5'-herausragenden Enden, z.B. solche nach BglII-, HpaII- oder AvaI-Restriktion, wurde 1h bei 37°C inkubiert, für DNA-Fragmente mit 5'-bündigen oder 5'-zurücktretenden Enden, wie z.B. nach einer AluI-Restriktion, wurde 1h bei 45°C inkubiert.

Die Reaktionsmischung wurde danach der Proteolyse unterworfen und phenolätherextrahiert. Die kinasierungsfertige Probe konnte, wenn sie nicht sofort endmarkiert wurde, zunächst gelagert werden.

2. Polynukleotidkinasereaktion

Alle in dieser Arbeit benutzten Ad2 DNA-Fragmente wurden in der T4 Polynukleotidkinasereaktion mit $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP nach vorhergehender Entfernung der 5'-Phosphatgruppen durch Alkalische Phosphatase 5'-^{32}P-endmarkiert, wobei für die Synthese des $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ATP und die Polynukleotidkinasereaktion genau den Vorschriften von Maxam und Gilbert (1980) gefolgt wurde.

V. DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

An dieser Stelle sollen die Prinzipien und molekularen Mechanismen der limitierten, basenspezifischen chemischen Reaktionen mit ^{32}P-endmarkierter DNA nicht mehr ausführlich dargestellt werden, da die Grundlagen von Maxam und Gilbert (1980) bis ins Detail beschrieben worden sind. Die zugrunde-

liegenden Reaktionen der Nukleinsäurechemie sind in den Jahrzehnten nach der Aufstellung des Watson-Crick-Modells gefunden worden (Baron und Brown, 1955; Cashmore und Peterson, 1978; Kochetkov und Budowskii, 1972; Lawley und Brooks, 1963; Temperli et al., 1964).

1. Reinigung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente über DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren

Die nach der Wiedergewinnung aus Polyacrylamidgelen vorliegenden DNA-Präzipitate sind noch mit kolloidal verteiltem Polyacrylamid verunreinigt. Wenn diese DNA-Fragmente weiter restringiert werden sollten, fiel diese Verunreinigung nicht ins Gewicht. Für singulär endmarkierte Proben, die den Sequenzierungsreaktionen zugeführt werden sollten, war allerdings eine weitere Reinigung erforderlich, da die Polyacrylamidreste einerseits den chemischen Angriff der die Basen modifizierenden Reagentien moderieren und andererseits subjektiv zu große Präzipitate vortäuschen.

Sehr reine DNA erhält man, wenn man sie über DEAE-Cellulosesäulen chromatographiert. Für Proben im µg-Bereich kann die Reinigung aber auch in Eppendorf-Hütchen durch Zugabe einer bestimmten Menge DEAE-Cellulosesuspension durchgeführt werden, was als Batch-Verfahren bezeichnet wurde.

Es war darauf zu achten, daß nur mit Dimethyldichlorosilan silikonisierte Geräte verwendet und die Reinigungen streng in Eis durchgeführt wurden. Alle Zentrifugationen wurden bei 4°C für 5 min. in der Eppendorf Mikrozentrifuge (9900xg) ausgeführt.

Benötigt wurden zwei Puffer verschiedener Ionenstärke:

Puffer A: 0,1 M NaCl
10,0 mM Tris-HCl pH=7,4
2,0 mM EDTA

Puffer B: 1,0 M NaCl
10,0 mM Tris-HCl pH=7,4
2,0 mM EDTA

Das DNA-Präzipitat wurde in 500 µl Puffer A für 15 min. bei 65°C gelöst. 2 ml DEAE 32-Cellulose-Puffergemisch (Whatman),

gut suspendiert, wurden kurz zentrifugiert (Minifuge) und der Überstand verworfen. Mit 2 x 10 ml Puffer A wurde die DEAE-Cellulose äquilibriert durch Invertieren, 5 min. Stehen in Eis und Zentrifugation. Der zweite Überstand besaß einen pH=7,4 und eine Konduktivität von 8,5 - 9,2 mS, er wurde verworfen. 1 ml äquilibrierte DEAE-Cellulose wurde in 1 ml Puffer A suspendiert und war so 3 Tage bei 4°C haltbar.

Die gelöste DNA wurde mit 50 µl 1:1-DEAE-Cellulosesuspension versetzt, und durch Rotation auf der 60° geneigten Scheibe für 10 min. adsorbiert. Danach wurde zentrifugiert, und die Überstände wurden aufbewahrt. Nachdem das Sediment mit 1 ml Puffer A gewaschen worden war, konnte die DNA mit 100 µl Puffer B unter manueller Agitation desorbiert werden. Die Desorption wurde 2mal mit je 100 µl Puffer B wiederholt, die Überstände konnten mit einer silikonisierten Pasteurpipette abgehoben werden, ohne daß DEAE-Cellulose-Sediment zu stark aufzuwirbeln, allerdings traten geringe Mengen DEAE-Cellulose doch in die Pasteurpipette über. Deshalb wurden die vereinigten Überstände nochmals zentrifugiert und dieser neue Überstand in ein Eppendorf-Hütchen gegeben.

Nach Zusatz von 10 µg E.coli t RNA wurde die DNA mit 1 ml -20°C Äthanol 96% unter Invertieren gefällt und 30 min. in ein Äthanol-Eisbad bzw. in ein Äthanol-Trockeneisbad für 5 min. gestellt. Nach der Zentrifugation wurde das Präzipitat mit 1 ml Äthanol 70%-0,3 M Natriumacetat und 2 x 1 ml -20°C Äthanol 96% gewaschen und dann im Exsikkator getrocknet Alle Überstände und die Proben wurden Cerenkov-gezählt.

2. Limitierte, basenspezifische chemische Spaltungen zur DNA-Sequenzierung ("Maxam-und-Gilbert-Reaktionen")

In dieser Arbeit sind in allen Fällen singulär 5'-^{32}P-endmarkierte, doppelsträngige DNA-Fragmente sequenziert worden. Die Fragmente wurden nach der Wiedergewinnung und Reinigung unmittelbar der limitierten chemischen Degradation unterworfen. Im folgenden werden zunächst die experimentellen Vorbereitungen, die Reagentien und Lösungen und danach die Arbeitsprozeduren für 5 basenspezifische Spaltungen beschrieben.

2.1. Experimentelle Vorbereitungen

Der Arbeitsplatz wurde so eingerichtet, daß die Wege vom Arbeitstisch zum Abzug, zum Wasserbad oder zur gekühlten Zentrifuge so kurz wie möglich waren, um die Reaktionen nach den Inkubationen ohne Zeitverlust stoppen und generell zügig arbeiten zu können. Neben dem Abzug, in dem alle Pipettierschritte mit Dimethylsulfat und Hydrazin ausgeführt wurden, befand sich ein auf 20°C eingestelltes temperaturkonstantes Wasserbad (Haake K mit Haake F3 Regelelektronik). Die Eppendorf Mikrozentrifuge 5412 war bei 4°C in einer Kühltruhe daneben untergebracht.

Die Proben und Reagentien wurden, wenn nicht pipettiert, inkubiert oder zentrifugiert wurde, ständig in Eis gehalten. Als Reaktionsgefäße dienten 1,5 ml Eppendorf-Hütchen, die mit 1% Dimethyldichlorosilan in Tetrachlormethan silikonisiert worden waren. Alle Überstände wurden mit kapillar ausgezogenen Pasteurpipetten abgenommen.

Für die Strangspaltung bei 90°C nach den Basenmodifikationen wurde ein Edelstahlständer für 14 Eppendorf-Hütchen, der mit einer dicken Edelstahlplatte unter Druck auf die Hütchendeckel zugeschraubt werden konnte, verwendet. Äthanol-Trockeneis-Mischung befand sich in einem mit Kunststoff beschichteten Starkglas-Dewargefäß. Alle Pipettiervorgänge wurden mit Glas-Mikropipetten ausgeführt.

2.2. Reagentien und Lösungen

2.2.1. Reagentien und Lösungen für alle Reaktionen

a) Alle Reaktionsansätze enthielten 1 µl Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) als Carrier-DNA, die folgendermaßen hergestellt wurde:

500 mg Kalbsthymus-DNA wurden ausgewogen und in 50 ml 0,3 M NaOH durch Inkubation bei 80°C für 2h gelöst. Anschließend wurde mit 0,5 M Tris-HCl, pH=8,0; 0,5 N HCl neutralisiert. Zunächst wurden 10 ml zugesetzt und der pH mit Indikatorpapier geprüft. Bei pH < 9 wurde mit dem Neutralisierungs-

gemisch unter pH-Meterkontrolle auf pH=7,5 heruntertitriert. Bei pH > 9 wurden nochmals 10 ml Neutralisierungsgemisch zugesetzt und der pH mit Indikatorpapier geprüft. Anschließend konnte auf pH=7,5 eingestellt werden. Die Probe war nach der pH-Einstellung viskös geworden, wurde nach kurzer Zeit aber wieder dünnflüssig. CT-DNA wurde auf 1 mg/ml verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

b) In allen Fällen wurde die Strangspaltung nach den Modifikationsreaktionen mit 100 µl 1,0 M Piperidin ausgeführt. Da pro Tag zumeist 2 Fragmente sequenziert wurden, reichten 1,0 ml frische Verdünnung aus. 0,9 ml H_2O bidest. wurden in ein 2 ml-Schraubgläschen pipettiert und 100 µl Piperidin p.A. (≙ 10 M) zugesetzt. Die Mikropipette wurde durch wiederholtes Aufziehen der Lösung gespült, um das am Glas haftende Piperidin quantitativ in Lösung zu bringen. Unter Vortexbenutzung wurde kräftig gemischt.

2.2.2. Reagentien und Lösungen für die einzelnen basenmodifizierenden Reaktionen

a) für die guaninspezifische Reaktion: G-Reaktion

1) Inkubationspuffer: 50 mM Natriumcacodylat pH=8,0
1 mM EDTA

Für 100 ml Puffer wurden 690 mg Cacodylsäure p.A. auf der Analysenwaage ausgewogen und in 80 ml H_2O bidest. gelöst. Nach Zusatz von 0,5 ml 0,2 M EDTA pH=7,4 wurde mit 1 N NAOH auf pH=8,0 eingestellt, auf 100 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt und durch Milliporefilter (0,22 µm) sterilfiltriert.

2) Dimethylsulfat p.A.

Wasserfreies Dimethylsulfat ist flüchtig und hygroskopisch und kann zu Methanol und Schwefelsäure hdrolysiert werden. Im Umgang mit Dimethylsulfat, das potentiell cancerogen ist, wurden deshalb dem Vorratsgefäß, das dicht verschlossen bei 4°C aufbewahrt wurde, unter dem Abzug jeweils nur wenige µl entnommen und in eine Serumampulle transferiert, die sofort in Eis gesetzt wurde. Alle mit Dimethylsulfat kontaminierten Mikropipetten, die Reaktionsüberstände und der Rest mit der Serumampulle wurden in 0,5 - 1 l 5 N NaOH beseitigt.

3. Dimethylsulfat-Stoppuffer: 1,5 M Natriumacetat pH=7,0
1,0 M 2-Mercaptoäthanol
100,0 µg/ml E.coli tRNA

Für 100 ml wurden gebraucht: 12,3 g Natriumacetat
7,0 ml 2-Mercaptoäthanol
1,0 ml E.coli tRNA (10 mg/ml)
80,0 ml H_2O bidest.

Die Lösung wurde mit Eisessig auf pH=7,0 eingestellt, auf 100 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt und durch Milliporefilter (0,22 µm) sterilfiltriert.

b) für die guanin- und adeninspezifische Reaktion: G+A-Reaktion

1. 88% Ameisensäure p.A. Sie wurde in einem 2 ml-Schraubgläschen bei 4°C vorrätig gehalten.

2. Ameisensäure-Stoppuffer (auch Hydrazin-Stoppuffer):
0,3 M Natriumacetat
0,1 mM EDTA
25,0 µg/ml E.coli tRNA

Für 10 ml wurden gebraucht: 1,0 ml 3 M Natriumacetat
5,0 µl 0,2 M EDTA pH=7,4
25,0 µl E.coli tRNA (10 mg/ml)
8,97 ml H_2O bidest. steril

Der Stoppuffer wurde wöchentlich neu hergestellt, da Puffer mit 0,3 M Natriumacetat schnell bakteriell kontaminiert sein kann.

c) für die cytosin- und thyminspezifische Reaktion: C+T-Reaktion, und die cytosinspezifische Reaktion: C-Reaktion

1. Hydrazin 95% p.A. Das leicht flüchtige und entflammbare Hydrazin wurde wie Dimethylsulfat unter dem Abzug portionsweise in Serumampullen abgefüllt. Die Vorratsflasche wurde dicht verschlossen bei 4°C aufbewahrt, damit Hydrazin nicht zu Diiminen oxidiert werden konnte. Alle mit Hydrazin kontaminierten Mikropipetten, die Reaktionsüberstände und wenige µl Rest mit der Serumampulle wurden in 0,5 - 1 l 3 M Eisen(III)-chloridlösung beseitigt.

2. Der Stoppuffer ist der bei der G+A-Reaktion beschriebene Puffer.

3. 5 M NaCl: C+T- und C-Reaktion unterschieden sich nur in der initialen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes voneinander. Während die C+T-Reaktion in rein wässerigem Millieu abläuft, reagiert in Anwesenheit von 1,5 M NaCl nur Cytosin mit Ringöffnung.

d) für die adenin- und cytosinspezifische Reaktion:
A>C-Reaktion

1. Inkubationspuffer: 1,2 N NaOH
1,0 mM EDTA

2. Neutralisations- und Stopplösung: 1,0 N Essigsäure und
E.coli tRNA (1 mg/ml)

2.3. Arbeitsprozeduren für die 5 limitierten basenspezifischen Spaltungen

Die nach der Reinigung als salzfreies Präzipitat vorliegende Fragment-DNA wurde in 35 µl oder, wenn die Höhe der Cerenkov-gezählten Radioaktivität einen zweiten Sequenzierungsgang erlaubte, in 70 µl H_2O bidest. steril durch Inkubation bei 65°C für 10 min. gelöst. Die Vollständigkeit der Lösung wurde durch kurzes Zentrifugieren überprüft. In dieser Form wurde die DNA in die Reaktionen eingesetzt.

2.3.1. Arbeitsprozedur für die G-Reaktion

200 µl Inkubationspuffer, 1 µl CT-DNA (1 mg/ml) und 5µl Fragmentlösung wurden in einem Eppendorf-Hütchen vereinigt, vortexgemischt und 30 sec. zentrifugiert. Nach dem Zusatz von 1 µl Dimethylsulfat wurde vortexgemischt, kurz zentrifugiert und genau 10 min. bei 20°C inkubiert. Wieder in Eis, wurde die Probe mit 50 µl Dimethylsulfat-Stoppuffer versetzt, vortexgemischt und kurz zentrifugiert. 750 µl -20°C Äthanol 96% wurden zupipettiert, durch mehrfaches Invertieren gemischt und 5 min. in Äthanol-Trockeneis gesetzt.

Die visköse Probe wurde 5 min. zentrifugiert. Hierbei war auf die Position der Eppendorf-Gefäße im Rotor zu achten: Alle Hütchen waren mit der Verbindungslasche zwischen Hütchen und Deckel zur Rotorperipherie hin orientiert. Das sehr

kleine DNA-Präzipitat befand sich so auf der Seite der Verbindungslasche, und der Überstand konnte vom gegenüberliegenden Gefäßboden langsam und ohne starken Sog abpipettiert werden.

Dann wurde das Präzipitat in 250 µl 0,3 M Natriumacetat (am Tag frisch bereitet) durch Vortexen gelöst, 30 sec. zentrifugiert, 750 µl -20°C Äthanol 96% wurden zugesetzt, invertiert und 5 min. wieder in Äthanol-Trockeneis gesetzt. Nach 5minütiger Zentrifugation unter obiger Bedingung wurde der Überstand abpipettiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 1 ml -20°C Äthanol 96% gewaschen und 5 min. zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde die Probe 20 - 30 min. im Exsikkator getrocknet.

Danach war die modifizierte DNA stabil, und es konnte abgewartet werden, bis alle weiteren Reaktionen ebenfalls bis zum Stadium der Strangspaltung gekommen waren.

Um bei der Strangspaltung bei 90°C ein Entweichen des Piperidins aus den Reaktionsgefäßen zu verhindern, wurde ein quadratisches Stück dehnbaren PVC-Bands unter die Hütchendeckel geklebt. Nach der Zugabe von 100 µl 1,0 M Piperidin wurden die Deckel fest in die Hütchen gepreßt. Dabei dehnte sich das PVC-Band und sorgte für einen dichten Gefäßschluß. Die DNA wurde durch Vortexen gelöst und kurz zentrifugiert. In dem oben beschriebenen Metallständer wurden die Proben 30 min. bei 90°C im Wasserbad inkubiert.

Danach wurde 30 sec. zentrifugiert und der Hütchendeckel samt PVC-Band mehrfach mit einer Injektionsnadel durchstochen. Die Proben wurden 5 min. in Äthanol-Trockeneis eingefroren. Zur Lyophilisation wurden die Proben in 45- oder 70 ml-Virtis--Gefäße gesetzt und über Nacht bei 0 - 10 Mikron, -55°C, am Gerät Unitrap II (Virtis, Gardiner, New York) lyophilisiert.

Am nächsten Tag wurde das Lyophilisat mit 1 Tropfen H_2O bidest. steril aus einer 1 ml-Pipette gelöst, erneut eingefroren und für 4 - 5h lyophilisiert. Danach wurde der Deckel der Reaktionsgefäße abgeschnitten, die Hütchen mit neuen Deckeln verschlossen, und die Proben wurden bei 4°C bis zur Auftragung auf Sequenzgele aufbewahrt.

Nach den basenmodifizierenden Reaktionen ist der Ablauf für die Strangtrennung und Lyophilisation für alle Reaktionstypen identisch, weshalb er bei den folgenden Reaktionen nicht erneut beschrieben wird.

2.3.2. Arbeitsprozedur für die G+A-Reaktion

Die Verwendung von 2 µl 1 M Piperidinformiat pH=2,0 als partiell depurinierendes Reagens und die nach der Originalvorschrift von Maxam und Gilbert (1980) vorgesehene 60minütige Inkubation bei 20°C wurde nach den ersten Sequenzierungen eingestellt, da diese Reaktionsbedingungen zu schlecht lesbaren Sequenzleitern in der Autoradiographie führten.

Als Reagens wurde nun 88% Ameisensäure eingesetzt, die Sequenzleitern waren nun deutlich lesbar. Darüberhinaus verringerte sich die Inkubationsdauer auf 10 min, und die vor der Strangspaltung notwendige Lyophilisation entfiel.

10 µl H_2O bidest. steril, 1 µl CT-DNA (1 mg/ml) und 10 µl Fragmentlösung wurden in einem Eppendorf-Hütchen vereinigt, vortexgemischt und 30 sec. zentrifugiert. Nach Zusatz von 50 µl 88% Ameisensäure wurde vortexgemischt, kurz zentrifugiert und genau 10 min. bei 20°C inkubiert. Wieder in Eis, wurde die Probe mit 180 µl Ameisensäure-Stoppuffer versetzt, vortexgemischt und kurz zentrifugiert. Alle weiteren Schritte entsprachen der Vorschrift für die G-Reaktion.

2.3.3. Arbeitsprozedur für die C+T-Reaktion

10 µl H_2O bidest. steril, 1 µl CT-DNA (1 mg/ml) und 10 µl Fragmentlösung wurden vereinigt, vortexgemischt und 30 sec. zentrifugiert. Nach dem Zusatz von 30 µl Hydrazin 95% wurde kräftig vortexgemischt, kurz zentrifugiert und genau 10 min. bei 20°C inkubiert. Wieder in Eis, wurde die Probe mit 200 µl Hydrazin-Stoppuffer versetzt, vortexgemischt und kurz zentrifugiert.

Alle weiteren Schritte entsprachen der Vorschrift für die G-Reaktion, mit der Ausnahme, daß die Proben 2 - 3 x mit 1 ml -20°C Äthanol 96% gewaschen wurden.

2.3.4. Arbeitsprozedur für die C-Reaktion

15 µl 5 M NaCl, 1 µl CT-DNA (1 mg/ml) und 5 µl Fragmentlösung wurden vereinigt, vortexgemischt und 30 sec. zentrifugiert. Alle weiteren Schritte entsprachen der Vorschrift für die C+T-Reaktion, bzw. nach dem Zusatz des Hydrazin--Stoppuffers der für die G-Reaktion, mit dem erwähnten 2 - 3maligen Äthanol-Waschschritt.

2.3.5. Arbeitsprozedur für die A>C-Reaktion

100 µl Inkubationspuffer, 1 µl CT-DNA (1 mg/ml) und 5 µl Fragmentlösung wurden vereinigt, vortexgemischt und 30 sec. zentrifugiert. Ein Stück quadratisches dehnbares PVC-Band wurde unter den Hütchendeckel geklebt und das Gefäß dicht geschlossen. Im Metallständer wurde die Probe 10 min. bei 90°C erhitzt. Danach wurde die Probe 30 sec. zentrifugiert und in Eis gesetzt. 150 µl 1 N Essigsäure und 5 µl tRNA (1 mg/ml) wurden zugesetzt, vortexgemischt und kurz zentrifugiert. Mit 750 µl -20°C Äthanol 96% wurde die DNA präzipitiert und das Präzipitat nur einmal mit 1 ml Äthanol 96% gewaschen, wie bei der G-Reaktion beschrieben.

Alle weiteren Schritte entsprachen der Vorschrift für die G-Reaktion.

3. Sequenzgelelektrophoresen

DNA-Sequenzierungstechniken, wie die der limitierten chemischen Degradation nach Maxam und Gilbert (1977, 1980) oder wie die der Abbruchreaktionen nach primerinduzierter Neusynthese von komplementären DNA-Strängen (Sanger et al., 1977), sind auf Polyacrylamidgelsysteme angewiesen, die Fragmente von nur einem Nukleotid Langenunterschied in der Autoradiographie diskriminieren können, und das über eine Gesamtlänge von mehreren Hundert Nukleotiden.

Im Zusammenhang mit der Autoradiographie haben Sequenzgele also folgende Anforderungen zu erfüllen: Die Bandendicke muß gering und der Abstand von Bande zu Bande deutlich ausgeprägt sein, ionische Diskontinuitäten sollten nicht vorhanden sein,

Banden dürfen im Gel nicht merklich diffundieren, und bevor die Strahlung aus der Bande den Röntgenfilm trifft, sollte sie so wenig wie möglich streuen. Darüberhinaus müssen während der Elektrophorese ständig denaturierende Bedingungen im Gel vorliegen.

In dieser Arbeit wurden 44 bzw. 65 cm lange Sequenzgele von 0,5 mm Gelstärke mit 8 bzw. 20% Polyacrylamid, 8,3 M Harnstoff und 100 mM Tris-Borat, pH=8,3, 2 mM EDTA (2fach TB-Puffer, s. II.4.3.1.2.) verwendet. In dem Bestreben, Herstellung, Aufstellung, Lauf und Exposition von Sequenzgelen zur Laborroutine zu machen, wurden die Angaben von Maxam und Gilbert (1980) so modifiziert, daß mehrere Sequenzgele an einem Tag gegossen und benutzt werden konnten.

3.1. Herstellung der Sequenzgele

Die Gelformen bestanden aus 0,6 cm starkem Kristallglas mit polierten Kanten von 44 bzw. 65 cm Länge und 28 cm Breite. Die Glasplatten trugen keinen Ausschnitt. Nach der Reinigung mit neutralem Spülmittel wurden sie zuerst mit Leitungswasser, dann mit vollentsal ztem Wasser sorgfältig gespült und bei 50°C getrocknet. Zum Zusammenbau der Gelformen wurden sie einzeln horizontal auf Plastikschüsseln gelagert und 0,5 mm starke Spacer aus Delrin, die 1 cm breit und so lang wie die jeweiligen Glasplatten waren, an der Längskante einer Platte aufgelegt. Die andere Glasplatte wurde deckungsgleich darübergelegt und die Form in diesem Zustand vertikal gestellt, um die Spacer zwischen den Platten zu richten. Die Formen wurden an jeder Seite so mit 3 großen Aktenklammern versehen, daß der von den Klemmbacken ausgeübte Druck über den Spacern lag.

Wieder in horizontaler Lage, wurden die Formen mit tesa-Gewebeband verklebt. An der unteren Gelkante wurde das Gewebeband doppelt verklebt und sehr gut angerieben, da beim Gießvorgang auf diesen Teilen ein relativ hoher hydrostatischer Druck herrschte. Danach wurden an beiden Seitenkanten 90° zur ersten Kleberichtung kurze Gewebebandstreifen mit hoher Zugkraft aufgebracht, und zwar zwischen den Aktenklammern, von denen nun auf jeder Seite 9 Stück befestigt wurden. In vertikaler Position waren die Gele nun gießbereit.

Die Gellösung für ein 65 cm langes 8%iges Sequenzgel (140 ml) wurde folgendermaßen bereitet:

10,64 g nicht rekrist. Acrylamid
0,56 g nicht rekrist. Bis
70,00 g Harnstoff p.A.

wurden in ein Becherglas eingewogen und mit 55 ml H_2O bidest. bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken gelöst. Nach Zugabe von 3 g Mischbettionenaustauscher wurde 30 min. gerührt und die Lösung danach durch Glasfaserfilter in einen Meßzylinder filtriert, in dem mit H_2O bidest. auf 126 ml aufgefüllt wurde. 14 ml 20fach TB-Puffer (hergestellt analog der Vorschrift in II.4.3.1.2.) wurden zugesetzt, umgeschüttelt und in einen Erlenmeyerkolben umgegossen.

Nach erneuter Erwärmung bei 37°C wurde die Lösung im Exsikkator bis zum "Sieden" evakuiert. Danach wurden 0,98 ml ebenfalls evakuierte APS-Lösung 10% zugesetzt und durch kurzes Schwenken eingemischt. 10 ml Gellösung wurden abgenommen und mit 10 µl TEMED versetzt, um einen Pfropf zu gießen. Dazu ließ man die 10 ml Lösung in gleichmäßigem laminaren Fluß am Rande eines Spacers einlaufen. Ca. 10 min. brauchte der Pfropf zur Polymerisation.

Der Hauptteil der Gellösung wurde mit 35 µl TEMED versetzt, kurz umgeschwenkt und mit einer 25 ml-Pipette ebenso vorsichtig wie beim Vorguß in die Gelform pipettiert. Sobald dennoch Luftblasen entstanden, wurde deren vollständiges Aufsteigen abgewartet, oder sie wurden durch Neigen der Gelform und durch leichtes Klopfen oder Drücken der Glasplatten zum Aufsteigen gebracht. Wenn die Gelform unter Meniskusbildung randvoll gefüllt war, wurden die Gelkämme symmetrisch eingeschoben. Sie bestanden aus 0,5 mm starkem Teflon und erlaubten die Bildung von 12 bzw. 13 Geltaschen mit jeweils 1,3 cm Breite und 2,7 cm Tiefe, wobei zwischen den Geltaschen ein Gelsteg von 0,3 cm Breite entstand.

Nach ca. 10 min. setzte die Polymerisation ein, die an der Schlierenbildung an der Geloberkante und unterhalb des Kammes zu erkennen war. Auch an der Verbindung zwischen Pfropf und Hauptgel lag eine Lichtbrechung vor, die aber auf die Trenneigenschaften in diesem Teil des Gels keinen Einfluß hatte.

Für ein 44 cm langes 20%iges Sequenzgel (100 ml) wurden folgende Mengen in ein Becherglas eingewogen:

19,0 g nicht rekrist. Acrylamid
1,0 g nicht rekrist. Bis
50,0 g Harnstoff p.A.

Die Substanzen wurden mit 30 ml H_2O bidest. bei 37°C unter gelegentlichem Umschwenken im Wasserbad gelöst. Nach Zugabe von 2 g Mischbettionenaustauscher wurde 30 min. gerührt, wobei ausfallender Harnstoff wieder kurz bei 37°C in Lösung gebracht wurde. Die Lösung wurde in einen Meßzylinder glasfaserfiltriert. In einigen Fällen mußte diese Filtration bei 40°C im Trockenschrank durchgeführt werden, um das Ausfallen des Harnstoffs zu verhindern. Mit H_2O bidest. wurde auf 90 ml aufgefüllt und 10 ml 20fach TB-Puffer zugesetzt.

Nach erneuter Erwärmung für 10 min. bei 37°C wurde die Lösung im Exsikkator bis zum "Sieden" evakuiert und 0,7 ml ebenfalls evakuierte APS-Lösung 10% durch kurzes Schwenken zugemischt. 5 ml Gellösung und 5 µl TEMED wurden zum Gießen des Pfropfs gebraucht. Der Hauptteil der Gellösung wurde mit 20 µl TEMED zur Polymerisation gebracht. Vor- und Hauptguß liefen ab wie beim 8%-Gel beschrieben.

3.2. Aufstellung und Präelektrophorese der Sequenzgele

Wie jedes andere Agarose- oder Polyacrylamidgel lassen sich Sequenzgele über einen Ausschnitt in einer Glasplatte an das obere Pufferreservoir anschließen. Bei langen Gelläufen von bis zu 17h können aber Undichtigkeiten zwischen Gelform und Pufferreservoir auftreten, die, selbst wenn der Elektrodenpuffer umgepumpt würde, zu einer ungleichmäßigen Wärmeabstrahlung an den Glasplatten führt. Als Folge entstünden Bandenverzerrungen, die das Ablesen der Autoradiographie erschweren. Maxam und Gilbert (1980) empfahlen deshalb, den Ausschnitt wegzulassen und mit dickem puffergetränkten Filterpapier eine Strombrücke zwischen Pufferreservoir und Gel herzustellen. Die hier gewählte Anordnung entsprach dieser Empfehlung.

1h nach dem Gießen wurde der Gelkamm gleichmäßig ohne Verkanten herausgezogen. Dieser Zeitpunkt war gewählt worden, weil nun das Gel durchpolymerisiert war und längere Wartezei-

ten vor dem Ziehen des Kamms zu einer schlangenförmigen Verformung der Gelstege zwischen den Geltaschen geführt hätte. Das Restpolymerisat in den Geltaschen wurde mittels einer 5 ml-Einmalspritze mit 0,4 x 42 mm-Dentalkanüle abgesaugt.

Sollte das Gel zunächst gelagert werden, wurden die Geltaschen mit 2fach TB-Puffer einmal aufgefüllt und wieder abgesaugt. Die Geltaschen wurden dann mit Überlagerungspuffer aufgefüllt, und die Oberkante des Gels wurde mit Frapan-Haushaltsfolie überzogen. Überlagerungspuffer wurde wie folgt hergestellt (100 ml): 50 g Harnstoff p.A. wurden in 53 ml H_2O bidest. bei 37°C gelöst. Nach Zugabe von 3 g Mischbettionenaustauscher wurde 30 min. gerührt und glasfaserfiltriert. Das Volumen wurde auf 90 ml aufgefüllt und 10 ml 20fach TB-Puffer zugemischt.

Sollte das Gel anschließend gebraucht werden, wurden die Geltaschen so oft mit 2fach TB-Puffer gewaschen, daß sie rückstandslos sauber waren.

Beschrieben wird nun die Aufstellung von Sequenzgelen zwischen zwei separaten Elektrophoresekammern, analog dazu geschah auch die Anbringung der 44 cm-Gele in einer Vertikalapparatur, die mit zwei verbundenen unteren Elektrophoresekammern die Arbeit mit zwei Gelen erlaubte.

Die obere Kammer, die mit Gewebeband rutschfest an vormarkierten Positionen Kante an Kante auf einer Regalglasplatte angebracht war, wurde randvoll mit 2fach TB-Puffer gefüllt. Ein die untere Kammer tragender Laborboy wurde an Markierungen auf dem Labortisch angelegt und mit Gewebeband befestigt. Die untere Kammer wurde halb mit 2fach TB-Puffer gefüllt.

Nach der Entfernung der Aktenklammern und der Säuberung der Glasflächen wurde das Sequenzgel auf 10 -13 cm unten vom Gewebeband befreit, Restpolymerisat aus den seitlichen Glasfugen entfernt und das Glas nochmals abgewischt. Das Sequenzgel mußte so in die untere Kammer gestellt werden, daß es dicht hinter einer Stützleiste in der Kammer, unter der die Platinelektrode verlief, anlag. Die Höhe des Laborboys wurde so eingestellt, daß die Glaskante des Gels und die obere Kammerkante höhengleich waren. 2 Eppendorf-Mikrotubes wurden als Abstandshalter zwischen Glas und Kammer hinter den Spacern eingesetzt.

Das Sequenzgel wurde mit Gewebeband an der oberen Kammer fixiert.

Die Geltaschen wurden aus der oberen Kammer so mit Puffer aufgefüllt, daß die Oberflächenspannung den Puffer über der Kante aufwölbte. 3MM-Papier in den Maßen 25 cm x 8 cm wurde vollständig mit Puffer in der oberen Kammer durchtränkt und dann auf die mit Puffer überwölbte Glaskante ziehend aufgelegt. Das Papier sollte knapp die Vorderkante bedecken. Nachdem nochmals Puffer über das Papier gegossen und evtl. auftretende Luftblasen durch leichtes Abheben des Papiers mit der Dentalkanüle entfernt worden waren, wurden Plexiglasstreifen als Verdunstungsschutz auf das Papier an der Kante gelegt, sie sollten die Mikrotubes nicht berühren.

Für die Präelektrophorese wurden je nach Geltyp folgende Spannungen gewählt: 8%-44cm-Gel: 1200 - 1300 V
20%-44cm-Gel: 1600 - 1700 V
8%-65cm-Gel: 1700 - 1800 V

Die Spannungen wurden von 0 V hochgeregelt und die Stromstärke auf 50 mA begrenzt. Die endgültigen Spannungen wurden nach der Temperaturmessung an der vorderen Glasplatte eingestellt: Alle Sequenzgele sollten in der Präelektrophorese eine Temperatur von 42 - 44°C erreichen. Der Temperaturmessung diente eine Anzeigeelektronik, die sich einer Halbleiterdiode als thermosensitives Element bediente (Borgman, 1980) und Temperaturen von -100°C bis +100°C linear messen konnte. Die Diode wurde kreuzweise mit zwei Gewebebandstücken luftblasenfrei ca 1/3 der Gellänge von der Oberkante entfernt in der Mitte der Glasplatte befestigt.

Die Präelektrophoresedauer betrug zumeist 1h. Bei Temperaturen über 50°C wurde die Spannung um 50 - 100 V heruntergeregelt und die Temperatur nach 15 min. erneut kontrolliert. Nach einiger Erfahrung mit der Temperaturregelung wurden 8%-65 cm-Gele nicht mehr spannungs-, sondern leistungskonstant elektrophoretisiert: Bei 74 W konst. schwankte die erwünschte Temperatur während der Elektrophorese nur um $\pm$ 1°C.

3.3. Auflagerung der Proben

Die nach den Sequenzierungsreaktionen vorliegenden Lyophilisate waren ^{32}P-Cerenkov-gezählt worden. Nach der vorhandenen Aktivität und der Notwendigkeit, einen bestimmten Geltyp laufen zu lassen, wurde entschieden, wieviel Gele mit den Proben beladen werden konnten. Pro Gel wurden jedem Lyophilisat 10 - 12 µl Denaturierendes Farbstoffgemisch zugesetzt, das sich wie folgt zusammensetzte: 80,0% (v/v) Formamid
10,0 mM NaOH
1,0 mM EDTA
0,1% (w/v) Xylencyanol
0,1% (w/v) Bromphenolblau

Das Eppendorf-Hütchen wurde manuell agitiert (Schnipsen mit Finger), kräftig vortexgemischt, nochmals agitiert und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden in einen Metallständer eingesetzt, der mit einer Deckplatte fest zugeschraubt werden konnte. Sie wurden 1 min. bei 90°C erhitzt, in einem Eis-Wasserbad schnell abgekühlt und 1,5 min. bei 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Präelektrophorese abgebrochen, die Plexiglasstreifen wurden entfernt und das 3MM--Papier auf die Hinterkante der oberen Kammer gelegt. Die Gel-Puffer-Grenze der zu beladenden Geltaschen wurde gekennzeichnet.

8 Geltaschen konnten nebeneinander beladen werden. Die äusseren 2 oder 3 Geltaschen wurden selten beladen, da die Banden sich während der Elektrophorese schrägstellten ("tailing") und die Auswertung erschwerten.

Die Proben wurden mit einer 10 µl-Kapillarpipette, in die eine stumpfe 0,4 x 42 mm-Dentalkanüle fest eingeschoben war, aufgelagert. 10 -12 µl Probe wurden mittels einer Pipettierhilfe aufgezogen, wobei die Saugkraft der Pipettierhilfe so klein wie möglich gehalten wurde. Die Dentalkanüle wurde bis knapp über die Grenze Gel-Puffer in die Geltasche gesenkt. Gleichmäßig und langsam trat nun die Probe aus der Kapillare aus, wenn die Druckkraft der Pipettierhilfe so klein wie möglich gehalten wurde. Sobald der Rest der Probe in der Dentalkanüle verschwand, wurde der Auslaß der Kanüle über die auf-

gelagerte Probe hochgezogen: Der Rest der Probe trat nun frei aus. Beim ersten Erscheinen einer kleinen Luftblase wurde die Kapillare ganz hochgezogen und entfernt.

Von links nach rechts wurde immer in folgender Reihenfolge aufgetragen:

Proben der G-Reaktion (s. 2.3.1.)
Proben der G+A-Reaktion (s. 2.3.2.)
Proben der C+T-Reaktion (s. 2.3.3.)
Proben der C-Reaktion (s. 2.3.4.)
(Proben der A>C-Reaktion in einigen Fällen; s. 2.3.5.)

3MM-Papier und Plexiglasstreifen wurden wie oben wieder angebracht, die Meßdiode wurde entfernt und eine Markierung für die gewählte Farbstoff-Laufstrecke auf die Glasplatte gezeichnet. Die Elektrophorese wurde mit der zuletzt eingestellten Spannung bzw. Leistung gestartet und die Zeit notiert.

Die Lauffronten der Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau im Denaturierenden Farbstoffgemisch bildeten die Marker für die Dauer der Elektrophorese. Bromphenolblau wanderte in Höhe des 20. - 25. Nukleotids und Xylencyanol in Höhe des 70. Nukleotids von der 5'-Endmarkierung. Ihre Positionen am Ende der Elektrophorese bestimmten, in welchem Bereich des analysierten Fragments die Nukleotidsequenz abgelesen werden konnte. Danach wurden die Sequenzgelelektrophoresen in Lauftypen eingeteilt (Tabelle 5).

3.4. Autoradiographievorbereitungen nach der Elektrophorese

Nachdem die Plexiglasstreifen und das 3MM-Papier entfernt worden waren, wurde auf dem Gewebeband oben an der Glasplatte die Gelspezifikation notiert: Fragmentbezeichnung
links G/rechts C (oder A>C)
Sequenzierungsnummer
Lauftyp
Datum

Polyacrylamid-konzentration(%)	Gellänge (cm)	Farbstoff (%Gellänge)	Elektrophorese-dauer (h)	Nukleotid-bereich
20	44	33/BPB	2,5	1.- 45.
8	44	33/XC	2,5	10.- 80.
8	44	50/XC	3,5	25.-100.
8	44	75/XC	4,5	40.-120.
8	44	150/XC (extrapol.)	10,0	100.-250.
8	65	33/XC	2,5	3.-120.
8	65	100/XC	9,0	70.-200.
8	65	150/XC (extrapol.)	14,0	120.-280.

Tabelle 5: Lauftypen bei der Sequenzgelelektrophorese
BPB ≙ Bromphenolblau
XC ≙ Xylencyanol

Das Gewebeband zwischen Oberkammer und Gel wurde durchschnitten, das Gel auf einer Plastikschale horizontal gelagert, das Gewebeband an den Längsseiten abgezogen und die Glasplatten wurden abgewischt. Mit einem dünnen Spatel wurden die Delrin--Spacer unten seitlich hervor- und dann der Länge nach unten herausgezogen.

Der kleine Spatel wurde unten in einer Spacerlücke angesetzt und das Gel von einer der Glasplatten hebelartig abgetrennt. Es wurde erst soweit hochgehebelt, daß Luft zwischen Gel und Glas ziehen konnte, und dann zügig abgehoben. Wenn das Gel an der oberen Glasplatte haftete, wurde das System ruhig und gleichmäßig umgewendet, nachdem das Gel den letzten Kontakt mit der Unterplatte verloren hatte. Die Gelseitenkanten wurden mit Fließpapier abgewischt, die Geltaschenstege mit einem Spatel abgeknipst und entfernt, die Pufferreste an den Geltaschen abgesaugt, die Fläche darüber trockengewischt und die Gewebebandstücke mit der Spezifikation seitenrichtig an dieser Stelle aufgeklebt.

Frapan-Haushaltsfolie in Gellänge mit 15 cm Zugabe oben und unten wurde rechtwinkelig an die Glaskante angelegt und trat langsam mit dem Gel in Kontakt. Mit sauberem Fließpapier wurde die Folie weiter nach oben auf das Gel gestrichen, Falten konnten durch einseitiges Anheben und Ziehen beseitigt werden. Ab Gelmitte wurde die Folie straffgezogen und konnte so bis zur Oberkante hin gleichmäßig aufziehen. Luftblasen wurden herausgestrichen, und die Folie wurde an den Kanten sauber umgelegt. Je zwei Gewebebandstücke wurden auf der Glasunterseite oben und unten außerhalb des Bereichs der benutzten Geltaschen, und 2 Gewebebandstücke an den Seiten in halber Länge angeklebt.

3.5. Sequenzgelautoradiographie

In der Dunkelkammer waren folgende Materialien bereitzuhalten:

2 Alufolien von 1,5facher Gellänge
1 langes Gewebebandstück mit vollständiger Spezifikation
1 saubere Deckglasplatte
große Aktenklammern
Schere
Kodak X-Omat R-Röntgenfilm (24 cm x 30 cm) oder
Kodak XR 5-Röntgenfilm

Die Glasplatte mit dem Gel wurde in die erste Alufolie gelegt. An einer Längsseite des ersten Films wurde ein kleines Rechteck herausgeschnitten und der Film, an der Gelunterkante anliegend, gerade auf das Gel gelegt. Der rechteckige Ausschnitt mußte sich auf der Seite des Gellaufs für die G-Reaktion befinden. Der zweite Film erhielt ebenfalls einen solchen Ausschnitt und wurde bei 44 cm langen Gelen an der Glasoberkante, bei 65 cm langen Gelen den Oberrand des ersten Films 1 - 1,5cm überlappend aufgelegt.

Die Deckglasplatte konnte dann an der Oberkante angelegt und nach unten unter Seitenkontrolle aufgelegt werden. Die Gewebebandstücke wurden um die Kanten gezogen und festgeklebt. Die Filme konnten nun nicht mehr verrutschen. Die Alufolie wurde um das Gel geschlossen und das Gel so in die zweite Alufolie

gelegt, daß die Lücke der ersten Alufolie verdeckt war. Die zweite Alufolie wurde dicht geschlossen und das Gewebeband mit der Gelspezifikation aufgeklebt. 44 cm-Gele wurden mit je 3 Aktenklammern seitlich und je einer oben und unten, 65 cm-Gele mit je 5 Aktenklammern seitlich und je einer oben und unten zusammengeklemmt.

Die Gele wurden nach ihrer Größe vertikal, schräg oder horizontal in eine lichtdichte Tiefkühltruhe (-20°C) verbracht und in einigen Fällen mit Bleigewichten beschwert. Die Expositionszeiten richteten sich nach der Radioaktivität der Lyophilisate nach den Sequenzreaktionen.

4. Sequenzdokumentation und Computerauswertung

Die bei der Ablesung von Sequenzleitern eines Autoradiogramms ermittelte Nukleotidsequenz wurde in eine Urliste eingetragen. Eine solche ist in Abb. 3 für ein HaeIII-Subfragment des doppelsträngig endmarkierten Ad2-BglII J/HinfI-2-Fragments zu sehen. Alle innerhalb eines bestimmten Fragmentstrangs aufgestellten Nukleotidsequenzen wurden basengenau untereinandergesetzt, und die korrekte Sequenz wurde für diesen Strang durch wiederholtes Lesen der Sequenzgele ermittelt. Ebenso wurde mit den entsprechenden komplementären Sequenzen verfahren, bis Strang und Komplementärstrang exakt einander zugeordnet werden konnten.

Die Gesamtinformation für das DBP-Gen befand sich schließlich auf einem mit den Nukleotidsequenzen aller sequenzierter Fragmente versehenen großen Faltblatt, das von Zeit zu Zeit neu kontrolliert, ergänzt und korrigiert werden konnte.

Die gesamte Einzel- oder Doppelstrang-Information wurde auf einer Diskette an einem egs-Terminal des Rechenzentrums der Ruhr-Universität Bochum abgespeichert. Die Diskette enthielt das Programm für das egs-Textsystem, mit dem sich Textdateiveränderungen durchführen ließen. Die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen oder anderer Signale, z.B. in der Aminosäuresequenz des DBP wurde durch die Anwendung von Such- und Ersetzungsbefehlen möglich.

Autoradiogramm	Fragmentbezeichnung	Sequenznr.	Strang	Additive Koordinaten	bp
101	BglII J/HinfI-2/HaeIII-2	20	5'l	1011 → 1214	203

Gelkonz.	Gellänge	Laufstrecke	Laufparameter	Exposition	Dauer	Lesung
8%	65cm	100% XC	1600 V/12h	22.5.84	3d	1.

	1		10	11		20	21		30	31		40	41		50
5'-	A	T	C	A	G	A	A	G	G	T	G	A	C	C	G
	T	G	C	C	C	G	G	T	C	T	G	G	G	C	G
	T	T	A	G	G	A	T	A	C	A	G	C	G	C	C
	T	G	G	C	A	T									

	51		60	61		70	71		80	81		90	91		100
	G	A	A	A	G	C	C	T	T	G	A	T	C	T	G
	C	T	T	A	A	A	A	G	C	C	A	C	C	T	G
	A	G	C	C	T	T	T	G	C	G	C	C	T	T	C
	A	G	A	A	G										

	101		110	111		120	121		130	131		140	141		150
	A	G	A	A	C	A	T	G	C	C					
	G	C	A	A	G	A	C	T	T	G					
	C	C	A	G	A	A	A	A	A	C					
	T														

	151		160	161		170	171		180	181		190	191		200

Abb. 3: Urliste mit der Nukleotidsequenz für das BglII J/HinfI-2/HaeIII-2-Fragment

Mit den Such- und Ersetzungsfunktionen ließen sich bis zu 15 Zeichen lange Zeichenfolgen ("strings") suchen und durch neue Strings ersetzen. Da z.B. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen in einer lückenlosen DNA-Sequenz oder in der Form von Decanukleotidabfolgen von diesen Such- und Erkennungsbefehlen nicht erkannt wurden, mußte die Sequenz in einem Triplettraster abgespeichert werden, beginnend mit dem ersten Nukleotid am 5'l-Ende der Sequenz.

Für die Erkennung eines Signals, z.B. einer Hexanukleotidsequenz, lagen somit immer 3 Möglichkeiten vor, wie am Beispiel der Erkennungssequenz der Endonuklease KpnI zu sehen ist:

1. 5'-GGT--ACC-3'
2. 5'-GG-TAC-C-3'
3. 5'-G-GTA-CC-3'

Nur eine Möglichkeit ist im Triplettraster an bestimmter Position verifiziert. So konnten 110 verschiedene Erkennungssequenzen von fast allen beschriebenen Endonukleasen des Typs II auf ihr Vorkommen im DBP-Gen untersucht werden.

Für die Aufstellung der hypothetischen Aminosäuresequenz des DBP wurden die Triplettcodons des genetischen Universalcodes, von dem bekannt war, daß er bei Adenovirus Typ 2 eingehalten wurde, durch die dreibuchstabigen Abkürzungen der Aminosäuren ersetzt.

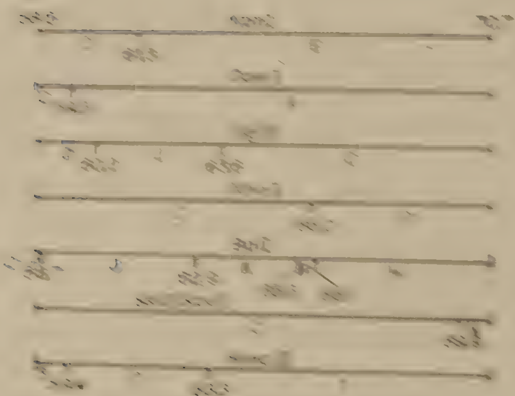
Weitere Signale, wie Initiations- und Terminationscodons, Poly(A)-Additionssignale, kleinere repetitive Sequenzen und die Aminosäureverteilung im DBP ließen sich ebenfalls mit dem Ersetzungssystem nachweisen und darstellen.

Die so gewonnenen Dateien wurden im Grossrechnerkontakt ausgedruckt.

E R G E B N I S S E

[illegible]

[illegible]



[illegible]

Da der Hauptkörper der DBP mRNA im EcoRI B-Fragment zwischen den Koordinaten 61,5 (3'-Terminus) und 66,6 (5'-Terminus) codiert wird, wurde zur tiefergehenden Analyse dieses Bereichs das Fragment BglII J (Koordinaten 60,2 - 63,6) und das Subfragment EcoRI B/BglII C (Koordinaten 63,6 - 70,7) benutzt, da diese beiden Fragmente die mRNA-Termini sicher einschlossen.

1. Restriktionsanalyse des BglII J-Fragments mit verschiedenen Endonukleasen

Aus der EcoRI B-Karte (Abb. 4) geht bereits hervor, daß das BglII J-Fragment von den Endonukleasen KpnI, BalI und HincII jeweils einmal gespalten wird, wobei folgende Subfragmente entstehen:

1. BglII J/KpnI D (60,2 - 61,3)
2. BglII J/KpnI E (61,3 - 63,6)
3. BglII J/BalI J (60,2 - 62,9)
4. BglII J/BalI K (62,9 - 63,6)
5. BglII J/HincII-2 (60,2 - 63,3)
6. BglII J/HincII-1 (63,3 - 63,6)

Die Größen dieser Subfragmente lassen sich in bp ausdrücken, wenn 1% des Ad2 Genoms zu 350 bp gesetzt wird:

1. BglII J/KpnI D: 1,1% ≙ 385 bp
2. BglII J/KpnI E: 2,3% ≙ 805 bp
3. BglII J/BalI J: 2,7% ≙ 945 bp
4. BglII J/BalI K: 0,7% ≙ 245 bp
5. BglII J/HincII-2: 3,1% ≙ 1085 bp
6. BglII J/HincII-1: 0,3% ≙ 105 bp

Adamkiewicz et al. (1978) haben das Molekulargewicht des BglII J-Fragment mit 0,83 x 10^6 Daltons angegeben. Wenn man das mittlere Molekulargewicht eines Nukleotidpaars zu 654 Daltons errechnet, ergibt sich für das BglII J-Fragment eine Größe von 1269 bp. Die Addition der obigen BglII J-Subfragmente führt aber immer nur zu einer Größe von 1190 bp, was auch auf die relative Ungenauigkeit durch die Gesamtkartierung des Ad2 Genoms zurückzuführen war.

Deshalb wurden die Größen des BglII J-Fragments und seiner beiden KpnI-Subfragmente durch Restriktion mit AluI und HpaII unter Verwendung von ØX174-HaeIII-Markerfragmenten erneut bestimmt.

Dazu wurde BglII J zunächst mit AluI und HpaII gespalten, die resultierenden Subfragmente 5'-^{32}P-endmarkiert und zusammen mit ebenfalls endmarkierten ØX174-HaeIII-Markerfragmenten auf einem 4%-Hayward-Polyacrylamidgel getrennt (Abb. 5):

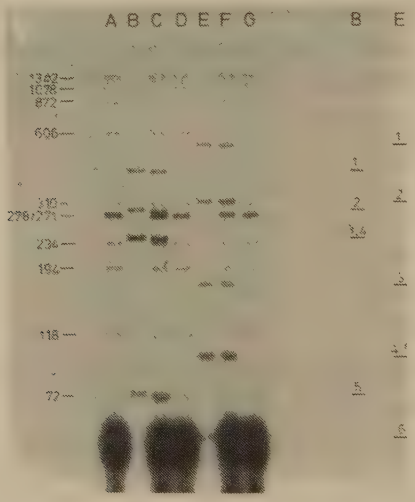


Abb. 5: Autoradiogramm von endmarkierten BglII J-Subfragmenten in einem 4%-Polyacrylamidgel
Legende:
Bahn A, D und G: ØX174-HaeIII-Fragmente
Bahn B: BglII J/AluI-Subfragmente
Bahn C: BglII J/AluI-Subfragmente + ØX-HaeIII
Bahn E: BglII J/HpaII-Subfragmente
Bahn F: BglII J/HpaII-Subfragmente + ØX-HaeIII
Links ist die bp-Größe der Markerfragmente, rechts ein Schema der Fragmentbanden angegeben (verändert aus Büttner und Veres-Molnar, 1980).

Es wurden 4 AluI-Subfragmente und 5 HpaII-Subfragmente im Autoradiogramm lokalisiert, die 3. AluI-und die 4. HpaII--Bande (vom Start) waren doppelt so intensiv wie die übrigen Banden. Sie schienen also durch 2 Fragmente gleicher Größe erzeugt zu werden. So ergab schließlich die Ermittlung der Fragmentgrößen und ihre Addition, daß nur die bp-Größen dieser Banden gedoppelt werden konnten, um zu einer vernünftigen Gesamtgröße von BglII J zu kommen. Im einzelnen sind folgende Größen bestimmt worden:

1. BglII J/AluI-1:	414 bp	
2. BglII J/AluI-2:	302 bp	
3. BglII J/AluI-(3+4):	245 bp	(jeweils)
4. BglII J/AluI-5:	73 bp	
	Σ= 1279 bp	
5. BglII J/HpaII-1:	530 bp	
6. BglII J/HpaII-2:	329 bp	
7. BglII J/HpaII-3:	170 bp	
8. BglII J/HpaII-(4+5):	97 bp	(jeweils)
9. BglII J/HpaII-6:	52 bp	
	Σ= 1275 bp	

Die Übereinstimmung in der additiven Größe für BglII J ist sehr gut, wenn man bedenkt, daß sich die Fehler der Bestimmung ebenfalls addieren.

Es war nun zu entscheiden, welche der AluI- und HpaII-Subfragmente im BglII J 5'-endständig sind.
Dazu wurde BglII J 5'-endmarkiert und mit KpnI bei der Koordinate 61,3 geschnitten. Die singulär endmarkierten KpnI-Subfragmente wurden mit AluI und HpaII restringiert und zusammen mit endmarkierten AluI- und HpaII-Subfragmenten von BglII J auf einem 4%-Polyacrylamidgel getrennt (Abb. 6).

Das endständige BglII J/KpnI E/AluI-Fragment ist identisch mit einem der beiden Subfragmente in der BglII J/AluI-(3+4)--Bande. Die Endmarkierung wurde wegen der kleineren Fragmentnr. dem BglII J/AluI-3-Fragment zugeordnet.

Ebenso deutlich ist zu erkennen, daß das endständige BglII J/KpnI D/AluI-Fragment mit dem BglII J/AluI-5-Fragment identisch ist.

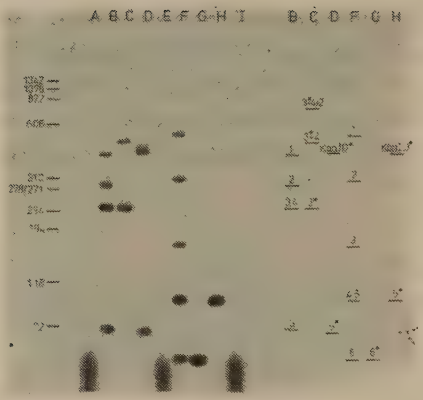


Abb. 6: Autoradiogramm zur Identifizierung der 5'-endständigen AluI- und HpaII-Subfragmente von BglII J
Legende:
Bahn A, E und I: ØX174-HaeIII-Fragmente
Bahn B: BglII J/AluI-Subfragmente
Bahn C: endständiges BglII J/KpnI E/AluI-Fragment
Bahn D: endständiges BglII J/KpnI D/AluI-Fragment
Bahn F: BglII J/HpaII-Subfragmente
Bahn G: endständiges BglII J/KpnI E/HpaII-Fragment
Bahn H: endständiges BglII J/KpnI D/HpaII-Fragment
Links ist die bp-Größe der Markerfragmente, rechts ein Schema der Subfragmente und der endständigen Fragmente angegeben (verändert aus Büttner und Veres-Molnar, 1980).

Für die endständigen BglII J/HpaII-Subfragmente lag folgendes Resultat vor: Das von BglII J/KpnI E abgeleitete endständige Fragment ist BglII J/HpaII-6, das von BglII J/KpnI D abgeleitete endständige Fragment konnte nur BglII J/HpaII-5 sein.

Im Verlauf der Arbeit wurden noch weitere einzelne Schnitte im BglII J-Fragment mit den Endonukleasen AvaI, HaeII, HaeIII, HinfI und HphI vorgenommen, die bei der Sequenzierungsstrategie (s. II.2.) aufgeführt werden.

2. Restriktionsfragmentkarte des BglII J-Fragments für die AluI- und HpaII-Subfragmente

Bei der Bestimmung der endständigen BglII J/AluI-Subfragmente gemäß Abb. 6 waren auch Partialverdauungsprodukte entstanden, die, wie die Analyse zeigte, als geordnete Produkte im Sinne der Partialanalyse nach Smith und Birnstiel (s. Material und Methoden, II.3.4.) angesehen werden konnten. Bei der AluI-Verdauung von BglII J/KpnI E waren zwei Partialprodukte zu sehen, die in ihrer Größe deutlich über dem größten Subfragment BglII J/AluI-1 (414 bp) lagen. Das erste darüberliegende Partialprodukt (485 bp) konnte sich nur aus dem endständigen BglII J/AluI-3 und seinem gleich großen Partner BglII J/AluI-4 zusammensetzen, andere Summationen hätten die Größe dieses Partialprodukts überschritten.

Das andere Partialprodukt (785 bp) mußte sich aus BglII J/AluI-3, BglII J/AluI-4 und BglII J/AluI-2 zusammensetzen, die Addition von BglII J/AluI-1 hätte auch hier die Größe des Partialprodukts überschritten.

Neben dem endständigen BglII J/AluI-5-Fragment bei der AluI--Verdauung von BglII J/KpnI D ist noch unverdautes BglII J/KpnI D-Fragment mit einer Größe von 430 bp zu erkennen (Bahn D in Abb. 6). BglII J/KpnI D setzt sich also aus dem endständigen BglII J/AluI-5 und einem großen Teil des BglII J/AluI-1--Fragments zusammen. Nach der Addition der Größen von BglII J/AluI-5 und BglII J/AluI-1 ($\sum$= 487 bp) liegt der rechte AluI-Schnittpunkt des BglII J/Alu-1-Fragments 63 bp rechts von dem KpnI-Schnitt im BglII J/KpnI E-Fragment.

Somit stand die Organisation der AluI-Subfragmente im BglII J fest.

Auch für die HpaII-Subfragmente von BglII J waren Partialverdauungsprodukte erhalten worden, deren Größenbestimmung auf gleiche Weise eine HpaII-Kartierung des BglII J erlaubte.

Die Restriktionsendonukleasekarte des BglII J-Fragments für AluI und HpaII, mit dem erneut bestimmten KpnI-Schnittpunkt, ist in Abb. 7 wiedergegeben.

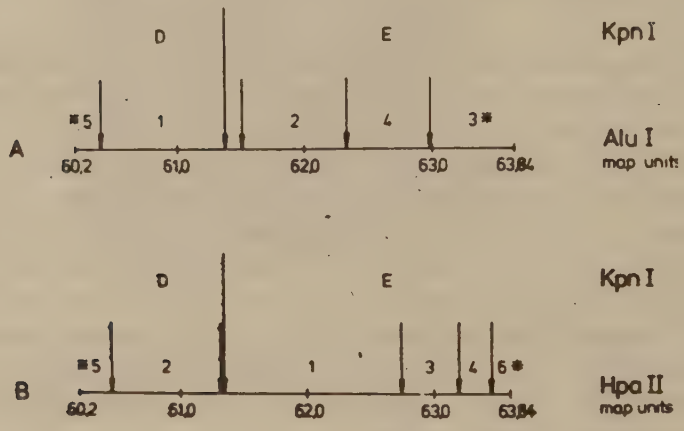


Abb. 7: AluI-(A)- und HpaII-(B)-Restriktionsendonukleasekarte des Ad2-BglII J-Fragments

Zur Berechnung der Kartenpositionen der AluI- und HpaII-Subfragmente wurde der BglII-Schnittpunkt bei 60,2 als Fixpunkt genommen, die Größe von BglII J auf 1277 bp (Mittelwert der AluI- und HpaII-Fragmentaddition) festgesetzt, die Größen der Subfragmente dazu ins Verhältnis gesetzt und auch die Koordinate für den rechten BglII-Schnittpunkt neu errechnet. Bei diesem sog. "aligning" muß also eine Konvention gefunden werden, die zu einem vertretbaren Kompromiß zwischen der Kartengenauigkeit und der korrekten Angabe der Schnittstellen führt. So ergaben sich für die Subfragmente folgende Werte:

1. BglII J/AluI-5: 60,20 - 60,40 ≙ 0,20% d. Genoms
2. BglII J/AluI-1: 60,40 - 61,51 ≙ 1,11% d. Genoms
3. BglII J/AluI-2: 61,51 - 62,32 ≙ 0,81% d. Genoms
4. BglII J/AluI-4: 62,32 - 62,98 ≙ 0,66% d. Genoms
5. BglII J/AluI-3: 62,98 - 63,64 ≙ 0,66% d. Genoms

6. BglII J/HpaII-5: 60,20 - 60,46 ≙ 0,26% d. Genoms
7. BglII J/HpaII-2: 60,46 - 61,35 ≙ 0,89% d. Genoms
8. BglII J/HpaII-1: 61,35 - 62,78 ≙ 1,43% d. Genoms
9. BglII J/HpaII-3: 62,78 - 63,24 ≙ 0,46% d. Genoms
10. BglII J/HpaII-4: 63,24 - 63,50 ≙ 0,26% d. Genoms
11. BglII J/HpaII-6: 63,50 - 63,64 ≙ 0,14% d. Genoms

Für die Schnittstelle von KpnI ergab sich die neue Position 61,36, auf Grund der Fragmentgröße liegt der Schnitt aber kurz hinter dem HpaII-Schnitt bei 61,35 im BglII J/HpaII-1--Fragment.

Die hier vorgenommene Kartierung des BglII J-Fragments erwies sich als überaus wertvoll bei der Aufstellung der Sequenzierungsstrategie (s. II.2.) für das BglII J-Fragment.

3. Restriktionsanalyse des EcoRI B/BglII C-Fragments mit verschiedenen Endonukleasen

Auch für das EcoRI B/BglII C-Fragment lassen sich bereits aus den Daten für die Gesamtkartierung des Ad2 Genoms Endonukleaseschnittstellen aufzeigen (Abb. 4). XhoI schneidet einmal bei der Position 66,0, BalI zweimal bei den Positionen 65,6 und 66,1 und SstI/SacI schließlich einmal bei der Position 69,9, wobei folgende Subfragmente entstehen:

1. EcoRI B/BglII C/XhoI E: 63,6 - 66,0 ≙ 2,4% ≙ 840 bp
2. EcoRI B/BglII C/XhoI D: 66,0 - 70,7 ≙ 4,7% ≙ 1645 bp
3. EcoRI B/BglII C/BalI K: 63,6 - 65,6 ≙ 2,0% ≙ 700 bp
4. BalI P: 65,6 - 66,1 ≙ 0,5% ≙ 175 bp
5. EcoRI B/BglII C/BalI H: 66,1 - 70,7 ≙ 4,6% ≙ 1610 bp
6. EcoRI B/BglII C/SstI-SacI C: 63,6 - 69,9 ≙ 6,3% ≙ 2205 bp
7. EcoRI B/BglII C/SstI-SacI K: 69,9 - 70,7 ≙ 0,8% ≙ 280 bp

Das Molekulargewicht des EcoRI B/BglII C-Fragments wurde von Adamkiewicz et al. (1978) mit 1,55 x 10^6 Daltons angegeben. Bei der Umrechnung ergibt sich für EcoRI B/BglII C eine Größe von 2370 bp, wohingegen die Addition von den obigen zusammengehörenden Subfragmenten zu einer Größe von 2485 bp führt.

Da zum Zeitpunkt dieser Restriktionsanalyse die Genomkartierung mit XhoI und SstI/SacI noch nicht durchgeführt worden war, wurden zunächst die Größen der BalI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C neu bestimmt.

EcoRI B/BglII C wurde 5'-^{32}P-endmarkiert, und Aliquots der Markierung wurden in einem ersten Ansatz zusammen mit unmarkiertem EcoRI B/BglII C mit BalI restringiert. Die Proben wurden auf einem 4%-Polyacrylamidgel getrennt, das Gel wurde ethidiumbromidgefärbt, ausgewertet und anschließend autoradiographiert (Abb. 8).

Die Auswertung nach der Ethidiumbromidfärbung ergab folgende Größen für die BalI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C:

1.	EcoRI B/BglII C/BalI K:	733 bp
2.	BalI P:	233 bp
3.	EcoRI B/BglII C/BalI H:	1432 bp
	Σ=	2398 bp

Dieser Additionswert unterscheidet sich nur um 28 bp von dem von Adamkiewicz et al. (1978) ermittelten Wert. Allerdings erfolgte die Bestimmung von EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H im nichtlinearen Teil der ØX174-HaeIII-Standardkurve. Im Autoradiogramm B ist gut zu erkennen, daß EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H singulär endmarkiert sind und BalI P zwischen ihnen herausgeschnitten wird.

Nach einer Verdauung von EcoRI B/BglII C mit HpaII und Auftrennung auf einem 2%-Agarosegel waren 4 gut voneinander trennbare HpaII-Subfragmente folgender Größe zu lokalisieren:

1.	EcoRI B/BglII C/HpaII-1:	1240 bp
2.	EcoRI B/BglII C/HpaII-2:	622 bp
3.	EcoRI B/BglII C/HpaII-3:	500 bp
4.	EcoRI B/BglII C/HpaII-4:	286 bp

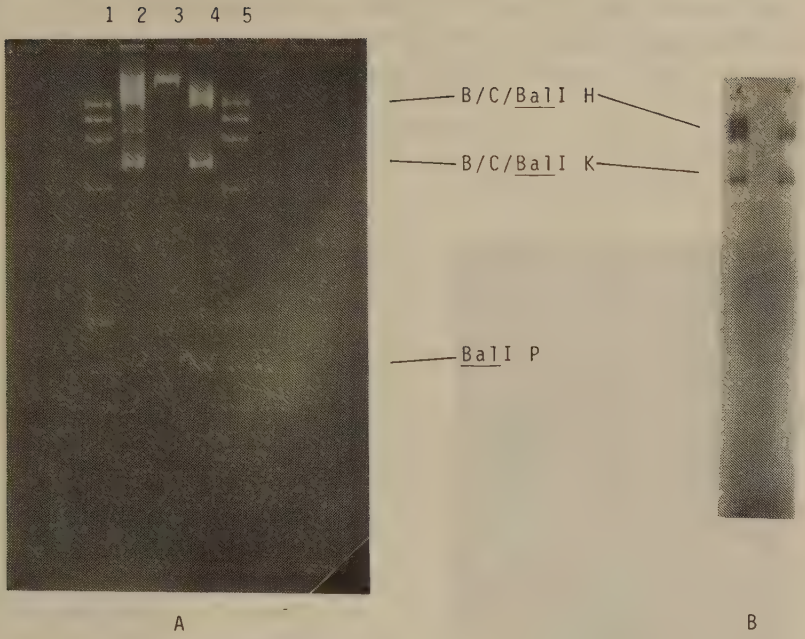


Abb. 8: Größenbestimmung der BalI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C; A: Ethidiumbromidfärbung, B: Autoradiogramm eines 4%-Polyacrylamidgels

Legende:

Bahn 1 und 5: ØX174-HaeIII-Markerfragmente

Bahn 2: BalI-Verdauung von 1 µg EcoRI B/BglII C + ca. 17000 cpm 5'^{32}P-EcoRI B/BglII C

Bahn 3: 1 µg EcoRI B/BglII C

Bahn 4: BalI-Verdauung von 1 µg EcoRI B/BglII C + ca. 7000 cpm 5'-^{32}P-EcoRI B/BglII C

Die Größenaddition dieser Subfragmente ($\sum$= 2648 bp) lag 163 bp über derjenigen, die nach Addition der EcoRI B/BglII C--Subfragmente aus der Genomkartierung erhalten worden waren.

So war wiederum eine Neubestimmung erforderlich, die durch HpaII-Verdauung von isoliertem, singulär endmarkiertem EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H unter Auftrennung auf einem 4%-Polyacrylamidgel durchgeführt wurde (Abb. 9).

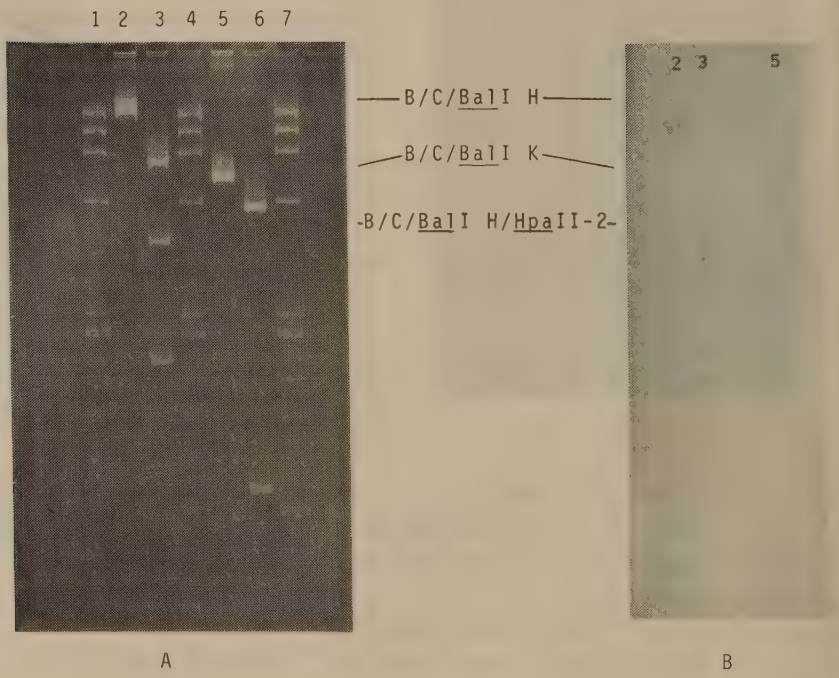


Abb. 9: Größenbestimmung der HpaII-Subfragmente von singulär endmarkiertem EcoRI B/BglII C/BalI H und EcoRI B/BglII C/BalI K; A: Ethidiumbromidfärbung, B:Autoradiogramm

Legende:

Bahn 1, 4 und 7: ØX174-HaeIII-Markerfragmente

Bahn 2: EcoRI B/BglII C/BalI H

Bahn 3: HpaII-Verdauung von EcoRI B/BglII C/BalI H

Bahn 5: EcoRI B/BglII C/BalI K

Bahn 6: HpaII-Verdauung von EcoRI B/BglII C/BalI K

4%-Hayward-Polyacrylamidgel

Den HpaII-Subfragmenten von EcoRI B/BglII C/BalI H und EcoRI B/BglII C/BalI K wurden folgende Größen zugeordnet:

1.	EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-1:	814 bp
2.	EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2:	482 bp
3.	EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-3:	249 bp
		∑= 1545 bp

4.	EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-1:	585 bp
5.	EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-2:	132 bp
		∑= 717 bp

EcoRI B/BglII C/BalI K selbst hat nach dieser Bestimmung eine Größe von 725 bp.

Aus dem Autoradiogramm B geht hervor, daß EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2 das rechtsendständige HpaII-Subfragment sein muß, es entspricht somit dem EcoRI B/BglII C/HpaII-3 (500 bp). Da kein endständiges HpaII-Subfragment von EcoRI B/BglII C/BalI K im Autoradiogramm detektiert werden konnte, mußte angenommen werden, daß ein sehr kleines endmarkiertes Fragment ("EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3") aus dem Gel herausgelaufen war.

Die Summe der Größen aller HpaII-Subfragmente der beiden endmarkierten EcoRI B/BglII C/BalI-Fragmente plus die Größe von BalI P führt mit 2495 bp zu einer Größe von EcoRI B/BglII C, die von allen Bestimmungen die der wahren Größe am weitesten angenäherte zu sein scheint.

In diesem Stadium der Analyse ließen sich bereits Oberlegungen zur Organisation der HpaII-Subfragmente im EcoRI B/BglII C anstellen, da ebenfalls festgestellt worden war, daß BalI P nicht von HpaII geschnitten wird. So kamen für die Abfolge der HpaII-Subfragmente unter Einschluß des kleinen nicht detektierten endständigen EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3, das nicht wesentlich größer als 10 bp sein konnte, die zwei folgenden Möglichkeiten in Betracht, beginnend mit dem linksterminalen Ende bei der Position 63,64 (Abb. 10).

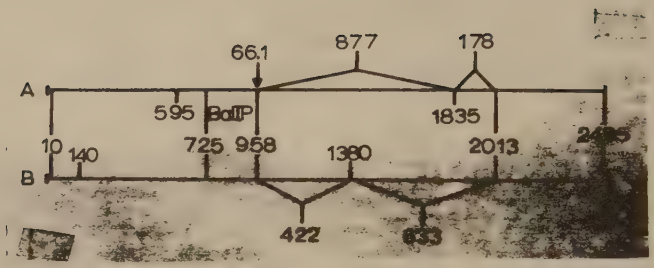


Abb. 10: Die 2 Möglichkeiten zur Anordnung der HpaII-Subfragmente im EcoRI B/BglII C-Fragment
Beschreibung s. Text

Auf das linksendständige EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3 kann entweder EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-1 (≙ EcoRI B/BglII C/HpaII-2) oder EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-2 folgen. Im ersten Fall wäre der dann entstehende Schnittpunkt 363 bp links von der BalI-Schnittstelle bei der Position 66,1 (rechtes Ende von BalI P), im zweiten Fall 818 bp von jener BalI-Schnittstelle entfernt. Da das rechtsendständige EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2 mit EcoRI B/BglII C/HpaII-3 identisch ist, kommt zur Überbrückung von BalI P in beiden Fällen nur EcoRI B/BglII C/HpaII-1 (1240 bp) als Folgefragment in Frage, da EcoRI B/BglII C/HpaII-4 (286 bp) in beiden Fällen als Folgefragment zu klein wäre.

Wäre die Abfolge nun EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3 + EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-2 + EcoRI B/BglII C/HpaII-1 (Fall B), so läge der zweite Hpa-Schnitt innerhalb von EcoRI B/BglII C/BalI H 1380 bp rechts von der Position 63,64, 422 bp rechts von dem BalI-Schnittpunkt bei der Position 66,1 und 633 bp links von dem rechtsendständigen EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2 entfernt.

Im Vergleich mit den ermittelten Größen von EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-1 (814 bp) und EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-3 (249 bp) wäre dem somit entstandenen 633 bp großen Fragment

das EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-1 zuzuordnen, wobei eine Differenz von 181 bp bestünde. Dem 422 bp großen hypothetischen Fragment müßte EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-3 zugeordnet werden, wobei eine Differenz von 173 bp vorläge.

Im anderen Fall (A) wäre die Abfolge EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3 + EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-1 + EcoRI B/BglII C/HpaII-1. Der zweite HpaII-Schnitt läge 1835 bp rechts von der Position 63,64, 877 bp rechts von dem BalI-Schnittpunkt bei der Position 66,1 und 178 bp links von dem rechtsendständigen EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2: EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-1 wäre dem 877 bp großen Fragment (Differenz 63 bp) und EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-3 dem 178 bp großen Fragment (Differenz 71 bp) zuzuordnen.

Obwohl die Tatsache, daß diese Differenzen immer noch beträchtlich sind - eine neue Größenbestimmung von EcoRI B/BglII C/HpaII-1 war erforderlich -, noch keine endgültige Kartierung zuließ, mußte eindeutig der Hypothese A den Vorzug gegeben werden.

EcoRI B/BglII C wird auch von AluI, EcoRII, HaeII und HaeIII geschnitten. Die HaeIII-Subfragmente besaßen nach einer ersten Auftrennung auf einem 4%-Polyacrylamidgel folgende Größen:

EcoRI B/BglII C/HaeIII-1:	621 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-2:	412 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-3:	326 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-4:	278 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-5:	206 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-6:	166 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-7:	128 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-8:	118 bp
EcoRI B/BglII C/HaeIII-9:	88 bp
	$\sum$= 2343 bp

Die Differenz bis zur Größe von EcoRI B/BglII C (2495 bp) konnte darauf beruhen, daß Subfragmente < 40 bp nicht im ethidiumbromidgefärbten Gel detektiert werden konnten.

Nach einer Endmarkierung aller AluI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C ergab sich im Autoradiogramm folgendes Muster der Subfragmente (Abb. 11):

EcoRI B/BglII C/AluI-1:	1100 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-2:	282 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-3:	262 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-4:	192 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-5:	181 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-6:	148 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-7:	86 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-8:	69 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-9:	55 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-10:	50 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-11:	39 bp
EcoRI B/BglII C/AluI-12:	33 bp
	Σ= 2497 bp

Abb. 11: Endmarkierte AluI- und HpaII-Subfragmente von EcoRI B/BglII C; Autoradiogramm eines 4%-Polyacrylamidgels

Bahn 1: EcoRI B/BglII C/AluI-Subfragmente

Bahn 2: EcoRI B/BglII C/HpaII-Subfragmente

(ØX174-HaeIII-Markerfragmente nicht gezeigt)

Man sieht, daß man durch Autoradiographie in die Lage versetzt wird, alle kleinen AluI-Subfragmente nachweisen zu können. Die Summation der Größen der AluI-Subfragmente führt zu einer Größe von EcoRI B/BglII C, die fast genau mit der der Summation von EcoRI B/BglII C/BalI/HpaII-Subfragmenten übereinstimmt.

Die beiden prominenten Banden im Autoradigramm (181 bp und 148 bp) dürften die der endständigen Fragmente sein, da sie neben ihren AluI-Schnittstellen einmal eine BglII-(63,64)- und einmal eine EcoRI-(70,7)-Schnittstelle besitzen, die beide 5'-herausragende Enden machen, die wesentlich effizienter in der Polynukleotidkinasereaktion zu endmarkieren sind als AluI-Enden, wie die der anderen AluI-Subfragmente (Lillehaug et al., 1976).

Das Autoradiogramm (Abb. 11) zeigt zusätzlich alle endmarkierten HpaII-Subfragmente von EcoRI B/BglII C, einschließlich des kleinen linksendständigen Fragments EcoRI B/BglII C/HpaII-5.

Da EcoRI B/BglII C/HpaII-Subfragmente nach einer rigoros genauen Größenbestimmung auch als Markerfragmente eingesetzt werden sollten, wurden die endmarkierten Fragmente in einem 4%-Polyacrylamidgel mit TB-Puffer und 2M Harnstoff getrennt. Der Zusatz von 2M Harnstoff führt zu einer Bandenschärfung im Gel, die die exakte Auswertung des Autoradiogramms erleichtert. Die Auswertung ergab folgende Werte:

EcoRI B/BglII C/HpaII-1:	1144 bp
EcoRI B/BglII C/HpaII-2:	589 bp
EcoRI B/BglII C/HpaII-3:	473 bp
EcoRI B/BglII C/HpaII-4:	249 bp
EcoRI B/BglII C/HpaII-5:	25 bp
	$\sum$= 2480 bp

Unter anderem wurden die endmarkierten EcoRI B/BglII C/HpaII-Subfragmente als Marker bei der Größenbestimmung der XhoI--Fragmente von EcoRI B/BglII C benutzt. Die neuen Werte für die XhoI-Subfragmente waren:

1. EcoRI B/BglII C/XhoI E: 877 bp
2. EcoRI B/BglII C/XhoI D: 1603 bp

Eine Neubestimmung der Größen der HaeIII-Subfragmente von EcoRI B/BglII C wurde angestrebt, nachdem gezeigt werden konnte, daß bei der Verdauung von doppelsträngig endmarkiertem EcoRI B/BglII C mit HaeIII ein singulär endmarkiertes Subfragment von 126 bp Größe entstand. Das zweite wesentlich kleinere Endfragment war im Autoradiogramm nicht nachzuweisen, da es aus dem Gel herausgelaufen zu sein schien. Die Größe des gefundenen Endfragments entspricht EcoRI B/BglII C/HaeIII-7 (128 bp).

Um zu entscheiden, zu welchem EcoRI B/BglII C/BalI-Fragment das endständige HaeIII-Subfragment gehörte, wurden singulär endmarkiertes EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H mit HaeIII, nochmals mit HpaII, aber auch mit AluI verdaut, auf einem 4%-Haywardgel getrennt, ethidiumbromidgefärbt und autoradiographiert (Abb. 12).

Die Auswertung der Ethidiumbromidfärbung zeigte folgende Resultate:

EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-1:	587 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-2:	130 bp

EcoRI B/BglII C/BalI K/HpaII-3 war weder in der Ethidiumbromidfärbung noch im Autoradiogramm nachzuweisen.

EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-1:	399 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-2:	281 bp
	$\sum$= 680 bp

Aus der Summation ergibt sich, daß einige kleine Subfragmente, unter denen sich auch das linksendständige Subfragment befinden muß, nicht im Gel erfaßt werden. Die beiden EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-Fragmente entsprechen EcoRI B/BglII C/HaeIII-2 (412 bp) und EcoRI B/BglII C/HaeIII-4 (278 bp).

AluI hatte EcoRI B/BglII C/BalI K partialverdaut: In der Ethidiumbromidfärbung sind 10 Verdauungsprodukte mit Partialverdauungsprodukten zu erkennen. Im Autoradiogramm waren nur 5 endmarkierte Produkte vorhanden. Darunter befindet sich zunächst einmal das linksendständige Subfragment EcoRI B/BglII C/AluI-6 (hier 147 bp; bei der Endmarkierung aller AluI-Subfragmente 148 bp). Die Auswertung der darauf aufbauenden Partialprodukte im Autoradiogramm zeigte, daß eine Partial-

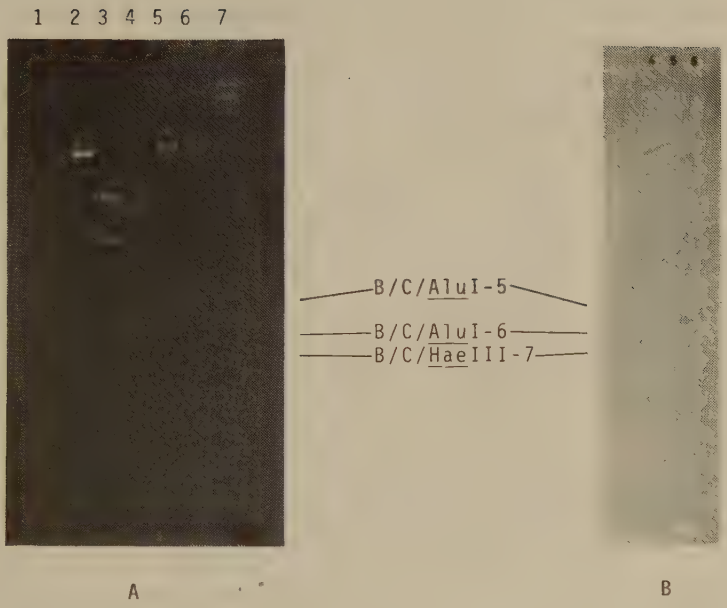


Abb. 12: Bestimmung der endständigen Subfragmente von EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H bei AluI-, HaeIII-und HpaII-Verdauung

Legende:

Bahn 1: ØX174-HaeIII-Markerfragmente + Bahn 7

Bahn 2: EcoRI B/BglII C/BalI K + HpaII

Bahn 3: EcoRI B/BglII C/BalI K + HaeIII

Bahn 4: EcoRI B/BglII C/BalI K + AluI

Bahn 5: EcoRI B/BglII C/BalI H + HaeIII

Bahn 6: EcoRI B/BglII C/BalI H + AluI

A: Ethidiumbromidfärbung

B: Autoradiogramm eines 4%-Hayward-Polyacrylamidgels

analyse nach Smith und Birnstiel möglich war. Die Partialprodukte hatten folgende Größen:

1. unverdautes EcoRI B/BglII C/BalI K: 748 bp
2. Partialprodukt 1 : 365 bp
3. Partialprodukt 2 : 339 bp
4. Partialprodukt 3 : 279 bp
5. EcoRI B/BglII C/AluI-6 : 147 bp

Die Differenzbildung vom endständigen Fragment zum darüberliegenden Partialprodukt usw. führt zu folgenden EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-Subfragmentgrößen in ihrer geordneten Reihenfolge vom linken Ende:

EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-2: 147 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-3: 132 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-4: 60 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-5: 26 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-1: 383 bp

Folgende endmarkierte AluI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C wurden diesen EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-Subfragmenten zugeordnet:

EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-2 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-6
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-4 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-9
EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-5 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-12

Zu EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-1 und EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-3 korrespondiert augenfällig kein EcoRI B/BglII C/AluI-Subfragment. Im Fall von EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-1 mußte angenommen werden, daß es im EcoRI B/BglII C/AluI-1 (1100 bp) enthalten ist; dieses Fragment müßte auch BalI P überlappen, da BalI P nicht von AluI geschnitten wird.

EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-2 und EcoRI B/BglII C/BalI K/AluI-3 könnten identische Größen haben: Das endmarkierte EcoRI B/BglII C/AluI-6 stellte somit eine Doppelbande dar, und die Größen dieser beiden Subfragmente fielen nur im additiven Verfahren der Partialanalyse auseinander.

Die Verdauung von EcoRI B/BglII C/BalI H mit HaeIII war vollständig, die 5 Subfragmente konnten den entsprechenden EcoRI B/BglII C/HaeIII-Fragmenten zugeordnet werden:

EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-1 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-1
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-2 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-3
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-3 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-6
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-4 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-7
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-5 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-8

EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-4 ist das rechtsendständige endmarkierte Fragment.

Die Verdauung von EcoRI B/BglII C/BalI H mit AluI war teilweise inkomplett: Neben drei Subfragmenten, die AluI-Fragmenten von EcoRI B/BglII C zugeordnet werden konnten, entstanden drei Partialprodukte nebst unverdautem EcoRI B/BglII C/BalI H. Die Partialprodukte setzten sich aber nicht aus dem endmarkierten Fragment zusammen, eine Partialanalyse war nicht möglich. Die Subfragmente waren:

EcoRI B/BglII C/BalI H/AluI-1 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-3 (262 bp)
EcoRI B/BglII C/BalI H/AluI-2 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-4 (194 bp)
EcoRI B/BglII C/BalI H/AluI-3 ≙ EcoRI B/BglII C/AluI-5 (181 bp)

EcoRI B/BglII C/BalI H/AluI-3 ist das rechtsendständige endmarkierte Fragment.

Die BalI-Erkennungssequenz (5'-TGG↓CC A-3') schließt immer jene von HaeIII (5'-GG↓CC-3') mit ein. Da kein HaeIII-Subfragment von EcoRI B/BglII C mit einer Größe von 233 bp (≙ BalI P) gefunden wird, war anzunehmen, daß BalI P von HaeIII geschnitten wird.

Nach HaeIII-Verdauung von unmarkiertem BalI P wurde dann auch eine Bande von 208 bp detektiert, die Differenzbande zu 233 bp (≙ 26 bp) war im Ethidiumbromidgefärbten Gel nicht nachzuweisen.

4. Restriktionsfragmentkarte des EcoRI B/BglII C-Fragments für die HaeIII-, HpaII- und einen Teil der AluI-Subfragmente

Für die AluI-Subfragmente von EcoRI B/BglII C war bereits eine Partialverdauung zustandegekommen. Die linke Schnittstelle des EcoRI B/BglII C/AluI-1-Fragments (1100 bp) liegt 482 bp rechts

von dem BalI-Schnittpunkt bei der Position 66,1 im EcoRI B/BglII C/BalI H. Der 5'-Terminus des Hauptkörpers der DBP mRNA sollte bis zu dieser Position sicher eingeschlossen sein, so daß die Kartierung im EcoRI B/BglII C/BalI H-Fragment nicht weitergeführt werden mußte.

Es blieben die HpaII-Schnittstellen im EcoRI B/BglII C/BalI H und damit auch im EcoRI B/BglII C/BalI K festzulegen.

Die Organisation der EcoRI B/BglII C/HaeIII-Subfragmente wurde durch Partialanalyse von singulär endmarkiertem EcoRI B/BglII C/BalI K und EcoRI B/BglII C/BalI H aufgefunden. Abb. 13 zeigt das Autoradiogramm der Partialverdauungen von EcoRI B/BglII C/BalI H mit HaeIII und HpaII.

Bei der HaeIII-Partialverdauung sind alle endmarkierten Partialprodukte einschließlich des endmarkierten Fragments EcoRI B/BglII C/HaeIII-7 und des unverdauten EcoRI B/BglII C/BalI H vorhanden, wenn 5 µl HaeIII 1:10-verdünnt eingesetzt werden (Bahn 2). Beginnend mit dem ersten Fragment rechts von der Position 66,1 folgen die HaeIII-Subfragmente im EcoRI B/BglII C/BalI H so aufeinander:

EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-1 ≙ 597 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-3 ≙ 194 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-5 ≙ 122 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-7 ≙ 91 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-2 ≙ 300 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-6 ≙ 110 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-4 ≙ 131 bp

Diese Subfragmente korrespondieren zu folgenden Fragmenten nach EcoRI B/BglII C/HaeIII-Totalverdauung:

EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-1 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-1
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-3 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-6
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-5 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-8
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-7 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-9
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-2 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-3
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-6 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-8
EcoRI B/BglII C/BalI H/HaeIII-4 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-7

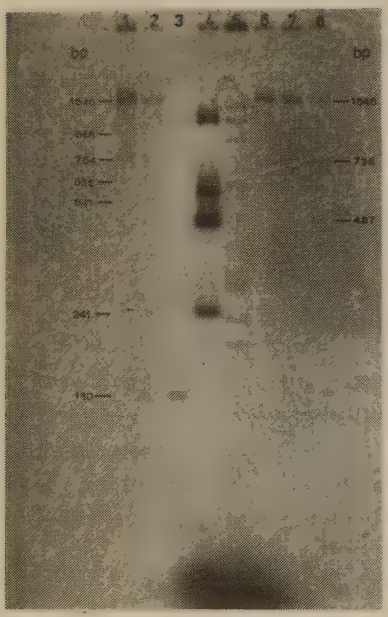


Abb. 13: Autoradiogramm nach Partialverdauung von EcoRI B/BglII C/BalI H mit HaeIII und HpaII

Legende:

Bahn 1: EcoRI B/BglII C/BalI H + 1 µl HaeIII 1:10

Bahn 2: EcoRI B/BglII C/BalI H + 5 µl HaeIII 1:10

Bahn 3: EcoRI B/BglII C/BalI H + 10 µl HaeIII 1:10

Bahn 4: Endmarkierte EcoRI B/BglII C/HpaII-Fragmente

Bahn 5: ØX174-HaeIII-Markerfragmente

Bahn 6: EcoRI B/BglII C/BalI H + 1 µl HpaII 1:10

Bahn 7: EcoRI B/BglII C/BalI H + 5 µl HpaII 1:10

Bahn 8: EcoRI B/BglII C/BalI H + 10 µl HpaII 1:10

Links sind die bp-Größen der HaeIII-, rechts die der HpaII-Partialprodukte aufgeführt.

Die korrekte Positionierung der HaeIII-Subfragmente auf dem Genom wurde auch durch Verdauung der sechs isolierten EcoRI B/BglII C/HpaII/BalI-Fragmente mit HaeIII bestätigt.

Die HpaII-Partialverdauung zeigt nun deutlich, daß die Möglichkeit A zur Anordnung der HpaII-Subfragmente im EcoRI B/BglII C (s. Abb. 10) die richtige ist. Von der Position 70,7 nach links folgen die Subfragmente so aufeinander:

EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-2: 487 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-3: 248 bp
EcoRI B/BglII C/BalI H/HpaII-1: 810 bp

Bei der Partialverdauung von EcoRI B/BglII C/BalI K mit HaeIII traten neben unverdautem EcoRI B/BglII C/BalI K und einem neu detektierten linksendständigen Subfragment (21 bp) zwei Partialprodukte von 345 und 109 bp Größe auf. Die HaeIII-Subfragmente folgen, beginnend bei der Position 63,64, so aufeinander:

EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-4: 21 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-3: 88 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-2: 236 bp
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-1: 405 bp

Diese Subfragmente wurden folgenden EcoRI B/BglII C/HaeIII-Fragmenten zugeordnet:

EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-4 ≙ neu detektiert
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-3 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-9
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-2 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-4
EcoRI B/BglII C/BalI K/HaeIII-1 ≙ EcoRI B/BglII C/HaeIII-2

EcoRI B/BglII C/HaeIII-5 (208 bp) repräsentiert das um 25 bp gekürzte BalI P; die Position dieses HaeIII-Schnittpunkts in BalI P wurde nicht bestimmt.

Die anhand dieser Resultate aufgestellte Restriktionsfragmentkarte (Abb. 14) ist mit einer neuen Gesamtgröße für EcoRI B/BglII C von 2520 bp berechnet worden. Die Erhöhung ist auf das Dazutreten der kleinen Subfragmente (21 - 25 bp) zurückzuführen. Der Fixpunkt für die Berechnung der Kartenpositionen war der neu berechnete BglII-Schnittpunkt bei 63,64.

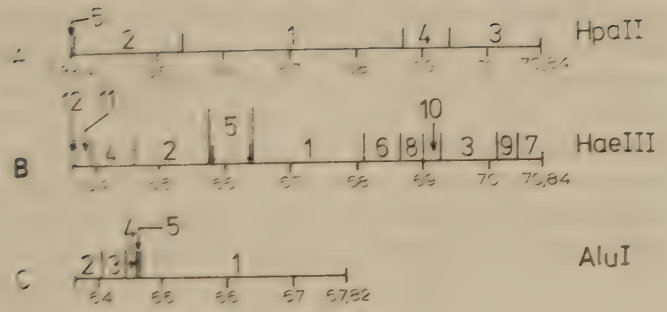


Abb. 14: HpaII-(A)-, HaeIII-(B)- und AluI-(C)-Restriktionsendonukleasekarte des Apa2-EcoRI B/BglII C-Fragments

Insbesondere die HaeIII- und AluI-Karte von EcoRI B/BglII C war bei der Aufstellung der Sequenzierungsstrategie für einen Teil von EcoRI B/BglII C gut verwendbar.

Für die Subfragmente ergaben sich folgende Koordinatenwerte:

1. EcoRI B/BglII C/HpaII-5 : 63,64-63,72 ≙ 0,08% d. Genoms
2. EcoRI B/BglII C/HpaII-2 : 63,72-65,42 ≙ 1,70% d. Genoms
3. EcoRI B/BglII C/HpaII-1 : 65,42-68,71 ≙ 3,29% d. Genoms
4. EcoRI B/BglII C/HpaII-4 : 68,71-69,44 ≙ 0,73% d. Genoms
5. EcoRI B/BglII C/HpaII-3 : 69,44-70,84 ≙ 1,40% d. Genoms

6. EcoRI B/BglII C/HaeIII-12: 63,64-63,70 ≙ 0,06% d. Genoms
7. EcoRI B/BglII C/HaeIII-11: 63,70-63,95 ≙ 0,25% d. Genoms
8. EcoRI B/BglII C/HaeIII-4 : 63,95-64,62 ≙ 0,67% d. Genoms
9. EcoRI B/BglII C/HaeIII-2 : 64,62-65,78 ≙ 1,16% d. Genoms

10. EcoRI B/BglII C/HaeIII-5 : 65,78-66,45 ≙ 0,67% d. Genoms
11. EcoRI B/BglII C/HaeIII-1 : 66,45-68,15 ≙ 1,70% d. Genoms
12. EcoRI B/BglII C/HaeIII-6 : 68,15-68,69 ≙ 0,54% d. Genoms
13. EcoRI B/BglII C/HaeIII-8 : 68,69-69,03 ≙ 0,34% d. Genoms
14. EcoRI B/BglII C/HaeIII-10: 69,03-69,29 ≙ 0,26% d. Genoms
15. EcoRI B/BglII C/HaeIII-3 : 69,29-70,15 ≙ 0,86% d. Genoms
16. EcoRI B/BglII C/HaeIII-9 : 70,15-70,46 ≙ 0,31% d. Genoms
17. EcoRI B/BglII C/HaeIII-7 : 70,46-70,84 ≙ 0,38% d. Genoms

18. EcoRI B/BglII C/AluI-2 : 63,64-64,06 ≙ 0,42% d. Genoms
19. EcoRI B/BglII C/AluI-3 : 64,06-64,44 ≙ 0,38% d. Genoms
20. EcoRI B/BglII C/AluI-4 : 64,44-64,61 ≙ 0,17% d. Genoms
21. EcoRI B/BglII C/AluI-5 : 64,61-64,68 ≙ 0,07% d. Genoms
22. EcoRI B/BglII C/AluI-1 : 64,68-67,82 ≙ 3,14% d. Genoms

II. Sequenzierung des Ad2 DBP-Gens in seiner proteincodierenden Region

Das Molekulargewicht des Ad2 DBPs wird nach Bestimmung in der SDS-PAGE mit 72 kD angegeben. Wenn die Molekulargewichte aller 20 Aminosäuren, aus denen sich natürlicherweise ein Polypeptid aufbaut, arithmetisch gemittelt werden, ergibt sich ein Wert von 136,7 Daltons. Obwohl es eine grobe Vereinfachung ist, die Aminosäurenzahl des DBPs mit diesem Wert zu berechnen, so vermag die Rechnung doch einen Eindruck über die Größe der entsprechenden proteincodierenden Region im DBP-Gen zu geben: Danach besäße DBP 526 Aminosäurereste, und analog dazu hätte der proteincodierende Teil der DBP mRNA 1578 Nukleotide.

Die Sequenzierung der entsprechenden DNA-Region begann in dem dem 3'-terminalen Bereich der DBP mRNA homologen Fragment BglII J/AluI-2. Im BglII J-Fragment wurde zunächst bis zur BglII-Schnittstelle bei der Position 63,64 sequenziert und, nachdem diese BglII-Schnittstelle sequenzgenau festgelegt worden war, wurde ein großer Teil des EcoRI B/BglII C-Fragments sequenziert.

Wo immer es möglich war, wurden beide Stränge eines DNA--Subfragments sequenziert. Die Erkennungssequenzen bereits eingesetzter Endonukleasen wurden durch die Analyse weiterer Fragmente, die diese Signale überlappten, gesichert.

Ausgehend von ganz unterschiedlichen Fragmenten und sekundären asymmetrischen Spaltungen sind etliche Bereiche zwei- oder dreimal sequenziert worden. Die beim ersten Sequenzierungsgang gefundenen Sequenzen ließen sich so bestätigen, oft aber auch eindeutig korrigieren. Unter Umständen muß ein ganz bestimmter Bereich noch häufiger sequenziert werden, wenn es bei in allen Punkten lege artis sequenzierten Fragmenten auf Grund von Häufungen eines Nukleotids zu Gellaufanormalien wie Bandenkompressionen oder Lückenbildungen kommt.

Mit fortschreitender Sequenzierung wurden Erkennungssignale weiterer Endonukleasen gefunden, die nun ihrerseits für die Präparation neuer Fragmente benutzt werden konnten.

1. Sequenzierung des BglII J/AluI-2-Fragments und Festlegung des Poly(A)-Additionssignals für die DBP mRNA

Die für die gesamte Sequenzierung notwendigen Prinzipien wurden bei der Sequenzierung des BglII J/AluI-2 aufgestellt, und die dabei gemachten Erfahrungen waren für die weitere Sequenzierung sehr wertvoll.

Ein Blick auf die AluI- und HpaII-Restriktionsfragmentkarte für BglII J (Abb. 7) zeigt, daß BglII J/AluI-2 (61,51 - 62,32) als ein Teil von BglII J/HpaII-1 (61,35 - 62,78) anzusehen ist. Bei der Suche nach Endonukleasen, die BglII J/AluI-2 einmal asymmetrisch schnitten, wurde zunächst HphI gefunden, das folgende Subfragmente lieferte:

BglII J/AluI-2/HphI-1 : 170 bp
BglII J/AluI-2/HphI-2 : 130 bp

Nach doppelsträngiger Endmarkierung von BglII J/AluI-2 konnten diese HphI-Subfragmente direkt sequenziert werden.

Mit AvaI wurde BglII J/AluI-2 symmetrisch geschnitten, die identisch großen Subfragmente hätten sich nicht getrennt isolieren lassen, aber BglII J/HpaII-1 wird von AvaI unter Bildung folgender Subfragmente asymmetrisch geschnitten:

BglII J/HpaII-1/AvaI-1: 300 bp
BglII J/HpaII-1/AvaI-2: 230 bp

Diese beiden Subfragmente wurden doppelsträngig endmarkiert und beide wurden mit AluI erneut geschnitten, wobei folgende singulär endmarkierte Fragmente entstanden:

BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-(2+4): 150 + 150 bp
BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-2: 150 bp
BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-1: 80 bp

Da BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-(2+4) in dieser Form nicht voneinander zu trennen waren, wurde nach einer Endonuklease gesucht, die ein Subfragment in dieser Doppelbande asymmetrisch schnitt, wobei ein unmarkiertes Subfragment herausfallen und das neue singulär endmarkierte Subfragment isolierbar sein sollte: Bei HaeIII-Verdauung entstand ein 60 bp großes endmarkiertes Fragment, ein 90 bp großes unmarkiertes Fragment fiel heraus, und das andere 150 bp große Fragment blieb intakt.

Da die Lage von BglII J/AluI-2 innerhalb von BglII J/HpaII-1 bekannt war, konnten durch die Größenbestimmung der BglII J/HpaII-1/AvaI-Subfragmente die Positionen der singulär endmarkierten BglII J/HpaII-1/AvaI/AluI-Subfragmente und damit auch die Lage der BglII J/AluI-2/HphI-Subfragmente angegeben werden, denn bei Doppelverdauung von BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-(2+4) mit HphI und HaeIII entstand ein sehr kleines singulär endmarkiertes Fragment von 15 bp Größe, d.h. HphI schneidet 170 bp rechts vom AluI-Schnittpunkt bei der Position 61,51 in die BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-(2+4)-Doppelbande. In Abb. 15 ist die Sequenzierungsstrategie für BglII J/AluI-2 wiedergegeben.

Nach Sequenzierung von 5'1-BglII J/AluI-2/HphI-1 waren in den Sequenzgelautoradiogrammen Längenheterogenitäten für dieses Fragment festzustellen, die sich durch das Auftreten von weiteren Banden über der normalerweise die Sequenzleiter begrenzenden, in allen 4 Bahnen gleichmäßig starken Bande ausdrück-

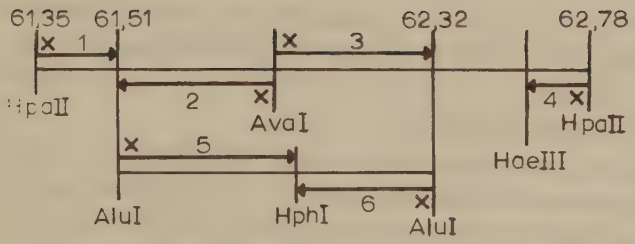


Abb. 15: Sequenzierungsstrategie für das Ad2-BglII J/AluI-2-Fragment

Legende:

x ≙ Position der singulären 5'-^{32}P-Endmarkierung

1. 5'l-BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-1 (75 bp)
2. 5'r-BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-2 (144 bp)
3. 5'l-BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-2 (152 bp)
4. 5'r-BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-4/HaeIII-2 (62 bp)
5. 5'l-BglII J/AluI-2/HphI-1 (160 bp)
6. 5'r-BglII J/AluI-2/HphI-2 (136 bp)

(In Klammern stehen die nach der Sequenzierung ermittelten wahren Fragmentgrößen.)

Erläuterung s. auch Text

ten. Das ließ auf das Vorkommen einer weiteren AluI-Schnittstelle nahe der Position 61,51 schließen, die ebenfalls endmarkiert worden war. In einem 10%-Polyacrylamidgel in TB-Puffer konnten diese BglII J/AluI-2/Hph-1-Species voneinander getrennt werden: Die Heterogenitäten traten danach nicht mehr auf. Die Existenz einer weiteren AluI-Schnittstelle konnte dann nach Sequenzierung von 5'l-BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-1 und 5'l-BglII J/HpaII-1/AvaI-2 (s. 2.) gezeigt werden.

Die 3'-terminale Region von 30 eukaryotischen mRNAs ist von Proudfoot und Brownlee (1976) auf das Vorkommen eines allen mRNAs gemeinsamen Signals, dessen Auftreten den Beginn der Poly(A)-Addition einleitet, untersucht worden: Sie fanden als gemeinsames Merkmal das Hexanukleotid 5'-AAUAAA-3', das 11 -

30 Nukleotide vor dem Start der Poly(A)-Sequenz liegt.

Bei der Untersuchung der 296 bp langen BglII J/AluI-2-Sequenz wurde im der DBP mRNA homologen r-Strang 135 Nukleotide von der AluI-Schnittstelle bei der Position 61,51 entfernt das Signal 5'-AATAAA-3' gefunden.

Durch Untersuchung und Sequenzierung der 3'-terminalen Region der Ad2-Hexon mRNA entdeckten Akusjärvi et al. (1981) ein neues Adenovirus-Gen, das für ein Polypeptid von 23 kD codieren kann. Ihre Untersuchungen zeigten ferner, daß die 23kD mRNA, die Hexon mRNA und die mRNA des Präkursor-Polypeptids VI an gleicher Position polyadenyliert werden; die 3'-Termini dieser mRNAs lagen auf dem für sie homologen l-Strang dem 3'-Terminus der DBP mRNA auf dem r-Strang gegenüber. Tatsächlich konnte eine 5'-AATAAA-3'-Sequenz auf dem l-Strang 114 Nukleotide von der AluI-Schnittstelle bei der Position 61,51 entfernt gefunden werden.

Die Sequenz für das BglII J/AluI-2-Fragment wird als integraler Teil der gesamten Sequenz für den proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens in 3. aufgeführt.

Die hier berichteten Ergebnisse über BglII J/AluI-2 sind von Büttner und Veres-Molnar (1980) und Veres-Molnar et al. (1981) bereits publiziert worden.

2. Aufstellung der Sequenzierungsstrategie für das BglII J- und EcoRI B/BglII C-Fragment

Die Sequenzierung des BglII J/AluI-2-Fragments wies den weiteren Weg zur Gesamtsequenzierung. So wurde z.B. BglII J/HpaII-1 nun nicht zuerst mit AvaI geschnitten, um die AvaI-Subfragmente endzumarkieren, sondern nach der Endmarkierung von BglII J/HpaII-1 wurde mit AvaI geschnitten und nun sofort sequenziert. Zusammen mit den singulär endmarkierten Subfragmenten 5'l-BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-1 und 5'r-BglII J/HpaII-1/AvaI-1/AluI-4/HaeIII-2 konnte das ganze BglII J/HpaII-1-Fragment sequenziert werden.

Die identisch großen, doppelsträngig endmarkierten BglII J/AluI-(3+4)-Fragmente wurden mit HpaII in vier isolierbare sin-

gulär endmarkierte Subfragmente geschnitten, die zusammen mit AluI-geschnittenem BglII J/HpaII-3 die Sequenzierung bis zur BglII-Schnittstelle bei der Position 63,64 erlaubten.

Da aber das BglII J/HpaII-4-Fragment bei diesem Vorgehen noch nicht erfaßt worden war, wurden die drei HinfI-Subfragmente von BglII J isoliert und insbesondere das BglII J/HinfI-2-Fragment (255 bp), das von dem BglII-Schnitt bei der Position 63,64 terminiert wird, konnte, nachdem es mit AluI oder HaeIII jeweils einmal geschnitten worden war, direkt sequenziert werden.

HinfI-Subfragmente lassen sich, weil ihre Schnittstellen 5'-herausragende Enden besitzen, sehr gut endmarkieren. Für die Sequenzierung des EcoRI B/BglII C-Fragments stellte sich die Frage, ob einzelne nach der Kartierung bekannte HpaII-, HaeIII- oder AluI-Subfragmente endmarkiert und sequenziert werden sollten, was z.B. bei der relativ komplizierten Organisation der HaeIII-Subfragmente zu einer Vielzahl von kleinen Subfragmenten geführt hätte, die alle hätten sequenziert werden müssen, oder ob endmarkierte HinfI-Subfragmente nicht einfacher mit HpaII, HaeIII oder AluI geschnitten werden konnten, wobei die singulär endmarkierten Subfragmente wesentlich größer als die HaeIII-Subfragmente gewesen wären.

Die Entscheidung fiel für die letztere Möglichkeit, als fünf HinfI-Subfragmente des großen Fragments BamI A/Xho E (2340 bp; 59,5 - 66,0) isoliert werden konnten, deren Lage innerhalb von BamI A/XhoI E bestimmt wurde. Beginnend mit der BamI--Schnittstelle bei der Position 59,5 treten folgende HinfI--Subfragmente nacheinander auf:

1. BamI A/XhoI E/HinfI-3 : 460 bp
2. BamI A/XhoI E/HinfI-1 : 805 bp
3. BamI A/XhoI E/HinfI-2 : 508 bp
4. BamI A/XhoI E/HinfI-5 : 262 bp
5. BamI A/XhoI E/HinfI-4 : 303 bp

Das BamI A/XhoI E/HinfI-2-Fragment schließt die BglII-Erkennungssequenz ein. Wenn BamI A/XhoI E/HinfI-2 doppelsträngig endmarkiert wird, führt der Schnitt mit verschiedenen Endo-

nukleasen zu folgenden Subfragmenten:

a) BamI A/XhoI E/HinfI-2, geschnitten mit BglII und HpaII:
   1. 5'l-BamI A/XhoI E/HinfI-2/BglII J/HpaII-3
      (Dieses Subfragment zeigt überlappend die AluI--Schnittstellen bei der Position 62,98.)
   2. 5'r-BamI A/XhoI E/HinfI-2/BglII C/HpaII-2

b) BamI A/XhoI E/HinfI-2, geschnitten mit Sau96I (AsuI):
   1. 5'l-BamI A/XhoI E/HinfI-2/Sau96I-1
      (Dieses Subfragment zeigt überlappend die BglII--Schnittstelle bei der Position 63,64.)
   2. 5'r-BamI A/XhoI E/HinfI-2/Sau96I-2

Aber bei geeigneter Wahl der Ausgangsfragmente ließen sich doch auch HaeIII- und HpaII-Subfragmente von EcoRI B/BglII C zur Sequenzierung heranziehen. Wurde EcoRI B/BglII C zunächst mit XhoI gekürzt, konnte aus dem EcoRI B/BglII C/XhoI E-Fragment bei HaeIII-Verdauung das EcoRI B/BglII C/HaeIII-2-Fragment isoliert, endmarkiert und mit HinfI geschnitten werden, wobei folgende Subfragmente anfielen:

   1. 5'l-EcoRI B/BglII C/XhoI E/HaeIII-2/HinfI-5
   2. 5'r-EcoRI B/BglII C/XhoI E/HaeIII-2/HinfI-4

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, das EcoRI B/BglII C/HpaII-2-Fragment mit AluI zu verdauen: Das EcoRI B/BglII C/AluI-3 ließ sich von dem um 25 bp verkleinerten EcoRI B/BglII C/AluI-2 abtrennen, endmarkieren und mit HinfI schneiden, wobei folgende Subfragmente entstanden:

   1. 5'l-EcoRI B/BglII C/HpaII-2/AluI-3/HinfI-2
   2. 5'r-EcoRI B/BglII C/HpaII-2/AluI-3/HinfI-5

Sehr günstig für die Sequenzierung der ersten 1000 Nukleotispaare rechts von der BglII-Schnittstelle bei der Kartenposition 63,64 war die Tatsache, daß die EcoRI B/BglII C/HaeIII-Subfragmente 4 und 2 asymmetrisch mit HinfI, wie oben schon für EcoRI B/XhoI E/BglII C/HaeIII-2 gezeigt wurde, und die BamI A/XhoI E/HinfI-Subfragmente 5 und 4 asymmetrisch mit HaeIII geschnitten werden konnten. Sequenziert wurden davon folgende Fragmente:

1. 5'l-EcoRI B/XhoI E/BglII C/HaeIII-4/HinfI-2
2. 5'r-EcoRI B/XhoI E/BglII C/HaeIII-4/HinfI-5
3. 5'l-BamI A/XhoI E/HinfI-5/HaeIII-4
4. 5'r-BamI A/XhoI E/HinfI-5/HaeIII-2
5. 5'l-BamI A/XhoI E/HinfI-4/HaeIII-2

Auch die AvaI-Produkte von doppelsträngig endmarkiertem EcoRI B/XhoI E/BglII C konnten direkt sequenziert werden:

1. 5'l-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-1
2. 5'r-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-4

Mit dem 5'l-EcoRI B/XhoI D/BglII C/Sau96I-1-Fragment (die Sau96I-Schnittstelle liegt außerhalb des sequenzierten Bereichs) wurde bis zum 1929. Nukleotid rechts vom Sequenzbeginn bei der HpaII-Schnittstelle 61,35 sequenziert. Das entspricht 5,4% des Ad2 Genoms und das 1929. Nukleotidpaar liegt somit bei der Kartenposition 66,75.

Nach den Arbeiten von Kitchingman et al. (1977) und Berk und Sharp (1977, 1978) wird der 5'-Terminus des Hauptkörpers der DBP mRNA auf der Ad2 DNA bei der Kartenposition 66,6 codiert. Unter der Arbeitshypothese, daß, wenn diese Kartenposition für den 5'-Terminus richtig ist, das dazugehörige Proteininitiationscodon in der Gesamtsequenz enthalten sein sollte, wurde die Sequenzierung bei diesem Stand abgebrochen.

Abb. 16 führt nochmals die komplette Sequenzierugsstrategie unter Angabe der Nukleotidkoordinaten (die Nummerierung beginnt willkürlich an der BglII-Schnittstelle bei der Position 60,2) und der Endonuklease-Schnittstellen vor Augen.

Abb. 17 und Tabelle 7 zeigen alle zur Aufstellung der Gesamtsequenz benutzten 5'l- und 5'r-Fragmentabschnitte bzw. listen sie mit ihrer Fragmentbezeichnung auf.

Nach dem im Teil "Material und Methoden, V.4." erläuterten Prinzip wurde dann die Gesamtsequenz erstellt.

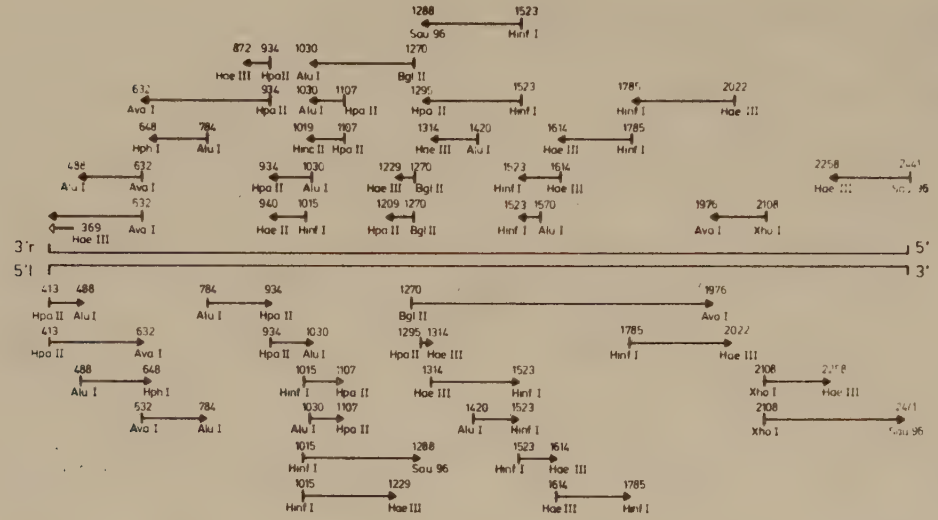


Abb.16: Sequenzierungsstrategie für den proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens

Legende:

1. Pfeilanfang ≙ 5'-Ende eines singulär endmarkierten Fragments
   Pfeilspitze ≙ 3'-Ende eines singulär endmarkierten Fragments
2. Die Nummerierung beginnt willkürlich an der BglII--Schnittstelle bei der Position 60,2.

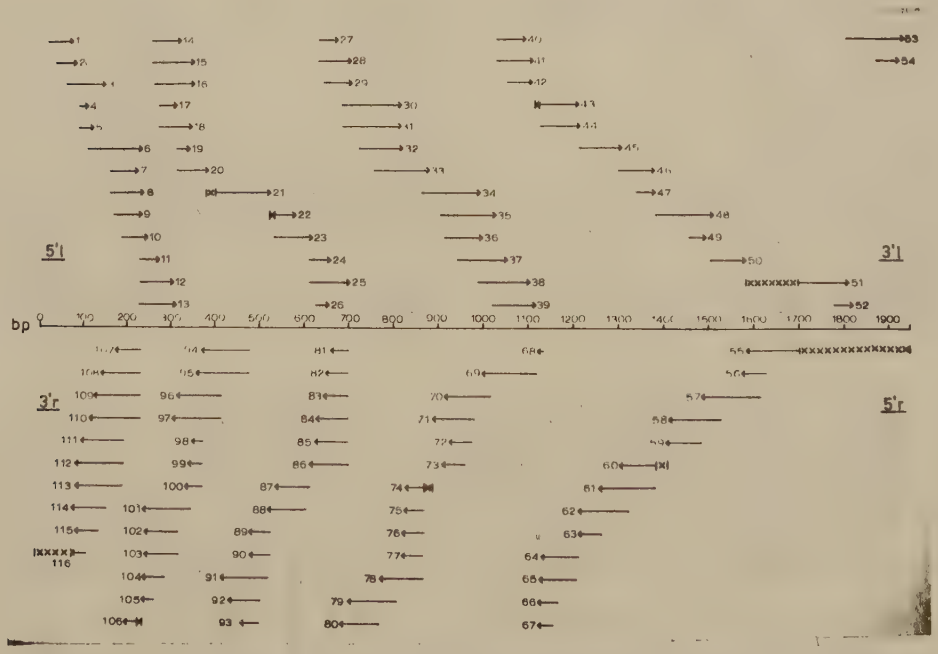


Abb. 17: Übersicht für alle zur Aufstellung der Gesamtsequenz benutzten 5'l-(Obere Hälfte)- und 5'r-(Untere Hälfte)-Fragmentabschnitte

Legende:

1. Pfeilanfang ≙ 5'-Ende eines Fragmentabschnitts
   Pfeilspitze ≙ 3'-Ende eines Fragmentabschnitts
2. |xxxxx| ≙ nicht sequenzierte Bereiche
3. Die Nummerierung der Fragmentabschnitte entspricht der in Tabelle 7.

Nr. in Abb.17	5'1-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
1	BglII J/HpaII-1/AvaI-2/ AluI-1	2- 49	44/20/ 33 BPB/27a
2	wie 1	21- 68	44/ 8/ 55 XC/27a
3	BglII J/HpaII-1/AvaI-2	49-139	44/ 8/ 75 XC/24a
4	BglII J/AluI-2/HphI-1	78- 95	44/20/ 33 BPB/17a
5	wie 4	78-110	44/20/ 33 BPB/21a
6	wie 4	97-218	44/ 8/ 50 XC/13a
7	wie 4	152-213	44/ 8/100 XC/25a
8	wie 4	152-223	44/ 8/100 XC/25a
9	wie 4	161-219	44/ 8/110 XC/21a
10	wie 4	183-236	44/ 8/150 XC/13a
11	BglII J/HpaII-1/AvaI-1 AluI-2	222-263	44/20/ 33 BPB/16a
12	wie 11	223-296	44/ 8/ 33 XC/ 9a
13	wie 11	223-307	44/ 8/33 XC/ 9a
14	wie 11	238-299	44/ 8/ 50 XC/18a
15	wie 11	242-333	44/ 8/ 50 XC/16a
16	wie 11	242-332	44/ 8/ 50 XC/16a
17	wie 11	259-294	44/ 8/ 66 XC/ 9a
18	wie 11	259-335	44/ 8/ 66 XC/ 9a
19	wie 11	302-327	44/ 8/110 XC/16a
20	wie 11	302-370	44/ 8/110 XC/16a
21	BglII J/AluI-4/HpaII-1	392-512	65/ 8/ 50 XC/ 6b
22	BglII J/HpaII-3/AluI-4	524-572	44/20/ 33 BPB/ 1b
23	wie 22	525-605	65/ 8/ 33 XC/ 4b
24	BglII J/HinfI-2/HaeIII-2	605-648	44/20/ 33 BPB/12b
25	BamI A/XhoI E/HinfI-2/ BglII J/HpaII-3	606-694	65/ 8/ 33 XC/32b
26	BglII J/AluI-3/HpaII-3	620-650	65/ 8/ 33 XC/ 7b
27	wie 26	620-659	44/20/ 33 BPB/18b
28	wie 26	621-694	65/ 8/ 33 XC/ 7b

Tabelle 7: Liste aller zur Aufstellung der Gesamtsequenz benutzten Fragmente mit ihren verschiedenen Gellauftypen inkl. Reexpositionen, passend zu Abb. 17

Tabelle 7, Fortsetzung:

Nr. in Abb.17	5'1-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
29	BglII J/AluI-3/HpaII-3	634- 695	65/ 8/ 50 XC/18b
30	BglII J/HinfI-2/HaeIII-2	677- 808	65/ 8/100 XC/20b
31	wie 30	677- 806	65/ 8/100 XC/20b
32	wie 30	710- 808	65/ 8/150 XC/20b
33	BamI A/XhoI E/HinfI-2/ Sau96I-1	748- 871	65/ 8/150 XC/36b
34	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ AvaI-1	862- 990	65/ 8/ 33 XC/23b
35	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-4/HinfI-2	903-1028	65/ 8/ 33 XC/57b
36	wie 35	906- 988	65/ 8/ 33 XC/48b
37	wie 35	943-1052	65/ 8/ 75 XC/57b
38	wie 35	987-1100	65/ 8/100 XC/48b
39	EcoRI B/BglII C/HpaII-2 AluI-3/HinfI-2	1011-1108	65/ 8/ 33 XC/59b
40	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-4/HinfI-2	1028-1091	65/ 8/150 XC/57b
41	wie 40	1028-1115	65/ 8/150 XC/48b
42	EcoRI B/BglII C/HpaII-2 AluI-3/HinfI-2	1051-1108	65/ 8/ 75 XC/59b
43	BamI A/XhoI E/HinfI-5/ HaeIII-4	1114-1200	65/ 8/ 33 XC/50b
44	wie 43	1115-1201	65/ 8/ 33 XC/44b
45	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-2/HinfI-5	1205-1302	65/ 8/ 33 XC/46b
46	wie 45	1298-1374	65/ 8/100 XC/46b
47	wie 45	1342-1374	65/ 8/150 XC/46b
48	BamI A/XhoI E/HinfI-4 HaeIII-2	1376-1506	65/ 8/ 33 XC/52b
49	wie 46	1457-1495	65/ 8/100 XC/52b
50	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HpaII-1/AvaI-5	1501-1578	65/ 8/ 33 XC/53b
51	EcoRI B/XhoI D/BglII C/ HpaII-1	1699-1808	65/ 8/ 33 XC/42b
52	EcoRI B/XhoI D/BglII C/ Sau96I/HaeIII-5	1777-1820	65/ 8/100 XC/55b

Tabelle 7, Fortsetzung:

Nr. in Abb.17	5'1-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
53	EcoRI B/XhoI D/BglII C/ Sau96I-1	1815-1929	65/ 8/100 XC/56b
54	wie 53	1882-1918	65/ 8/150 XC/56b

Nr. in Abb.17	5'r-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
55	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ AvaI-4	1697-1580	65/ 8/ 33 XC/24b
56	wie 55	1621-1572	65/ 8/100 XC/29b
57	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-2/HinfI-4	1607-1497	65/ 8/ 33 XC/47b
58	wie 57	1525-1411	65/ 8/100 XC/47b
59	wie 57	1482-1403	65/ 8/150 XC/47b
60	BamI A/XhoI E/HinfI-5/	1373-1294	65/ 8/ 33 XC/45b
61	wie 60 HaeIII-2	1372-1247	65/ 8/ 33 XC/51b
62	wie 60	1320-1210	65/ 8/100 XC/51b
63	wie 60	1263-1207	65/ 8/150 XC/51b
64	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-4/HinfI-5	1200-1121	65/ 8/ 33 XC/58b
65	wie 64	1199-1118	65/ 8/ 33 XC/49b
66	EcoRI B/BglII C/HpaII-2 AluI-3/HinfI-5	1156-1115	65/ 8/ 33 XC/60b
67	EcoRI B/XhoI E/BglII C/ HaeIII-4/HinfI-5	1145-1113	65/ 8/ 85 XC/58b
68	wie 67	1135-1112	65/ 8/100 XC/49b
69	BamI A/XhoI E/HinfI-2/ BglII C/HpaII-2	1112- 992	65/ 8/ 33 XC/33b
70	EcoRI B/BglII C/HpaII-2/ AluI-2/HaeIII-4	1006- 905	65/ 8/ 33 XC/62b
71	BamI A/XhoI E/HinfI-2/	973- 881	65/ 8/150 XC/37b
72	BamI A/XhoI E/HinfI-2/ BglII C/HpaII-2	967- 918	65/ 8/150 XC/33b
73	EcoRI B/BglII C/HpaII-2/ AluI-2/HaeIII-4	952- 903	65/ 8/ 85 XC/62b
74	BglII J/AluI-3/HpaII-6	862- 823	44/20/ 33 BPB/32b
75	BglII J/HinfI-2/HaeIII-6	862- 822	44/20/ 33 BPB/13b

Tabelle 7, Fortsetzung:

Nr. in Abb.17	5'r-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
76	BglII J/AluI-3/HpaII-6	862- 820	44/20/ 33 BPB/19b
77	wie 76	860- 817	65/ 8/ 50 BPB/ 9b
78	BglII J/HinfI-2/AluI-3	860- 763	65/ 8/ 33 XC/21b
79	wie 78	809- 698	65/ 8/ 75 XC/14b
80	wie 78	762- 677	65/ 8/120 XC/14b
81	BglII J/HpaII-3/AluI-3	698- 653	44/20/ 33 BPB/ 3b
82	BglII J/HpaII-3/HincII-2	697- 646	44/20/ 33 BPB/10b
83	BglII J/HpaII-3/AluI-3	695- 643	65/ 8/ 33 XC/ 3b
84	wie 83	695- 626	44/ 8/ 33 XC/ 2b
85	BglII J/HpaII-3/AluI-3	695- 621	44/ 8/ 33 XC/ 2b
86	BglII J/HpaII-3/HincII-2	695- 614	65/ 8/ 33 XC/10b
87	BglII J/AluI-4/HpaII-3	614- 526	65/ 8/ 33 XC/ 8b
88	BglII J/HinfI-1/HaeII-2	604- 520	65/ 8/ 33 XC/30 +31b
89	BglII J/HpaII-1/AvaI-1/ AluI-4/HaeIII-2	522- 477	44/20/ 33 BPB/28a
90	wie 89	522- 477	44/20/ 33 BPB/28a
91	BglII J/HpaII-1/AvaI-1	522- 417	44/ 8/ 33 XC/ 5b
92	wie 91	505- 435	65/ 8/ 50 XC/ 5b
93	BglII J/HpaII-1/AvaI-1/ AluI-4/HaeIII-2	502- 462	44/ 8/ 50 XC/28a
94	BglII J/HpaII-1/AvaI-1	475- 365	44/ 8/ 75 XC/23a
95	wie 94	475- 361	44/ 8/ 75 XC/23a
96	wie 94	409- 310	44/ 8/150 XC/23a
97	wie 94	409- 305	44/ 8/150 XC/23a
98	BglII J/AluI-2/HphI-2	372- 346	44/20/ 33 BPB/22a
99	wie 98	372- 341	44/20/ 33 BPB/19a
100	wie 98	371- 335	44/20/ 33 BPB/22a
101	wie 98	349- 241	44/ 8/ 50 XC/14a
102	wie 98	321- 246	44/ 8/ 80 XC/26a
103	wie 98	321- 246	44/ 8/ 80 XC/26a
104	wie 98	288- 238	44/ 8/110 XC/22a
105	wie 98	263- 239	44/ 8/150 XC/14a

Tabelle 7, Fortsetzung:

Nr. in Abb.17	5'r-Fragmente Fragmentbezeichnung	Sequenz-position	Gellaufparameter
106	BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-2	225- 198	44/20/ 33 BPB/20a
107	wie 106	224- 168	44/ 8/ 33 XC/11a
108	wie 106	222- 131	44/ 8/ 33 XC/10a
109	wie 106	222- 117	44/ 8/ 33 XC/10a
110	wie 106	222- 108	44/ 8/ 33 XC/11a
111	wie 106	188- 92	44/ 8/ 66 XC/10a
112	wie 106	188- 77	44/ 8/ 66 XC/10a
113	wie 106	184- 79	44/ 8/ 66 XC/11a
114	BglII J/AvaI-2/HaeIII-1	151- 63	65/ 8/100 XC/11b
115	BglII J/HpaII-1/AvaI-2/AluI-2	131- 79	44/ 8/110 XC/20a
116	wie 115	109- 76	44/ 8/150 XC/11a

Legende:

1. Unterstrichen sind die Nummern von Sequenzgelen, die ein zweites Mal exponiert wurden (Reexpositionen).
2. Die Sequenzpositionen entsprechen denen der Abb. 17 bzw. der Gesamtsequenz (Abb. 18).
3. Als Gellaufparameter folgen aufeinander: Gellänge (cm)/Polyacrylamidkonz.(%)/Lauffront(%d.Gellänge) und Farbstoff (BPB ≙ Bromphenolblau, XC ≙ Xylencyanol)/ Sequenzierungsnummer (a für 1980; b für 1981).

3. Die Nukleotidsequenz des Ad2 DBP-Gens in seiner protein-codierenden Region

Anhand des letztgültigen Computerausdrucks für den sequenzierten Bereich des Ad2 DBP-Gens wurde die doppelsträngige Nukleotidsequenz, so wie sie in Abb. 18 zu sehen ist, aufgestellt.

```
   1                10                  20                  30                  40
5'l-CCG GGG TAC CCA ACT CCA TGC TTA ACA GTC CCC AGG TAC AGC CCA
3'r-GGC CCC ATG GGT TGA GGT ACG AAT TGT CAG GGG TCC ATG TCG GGT
    HpaII
          KpnI
        50                  60                  70                  80                  90
CCC TGC GTC GCA ACC AGG AAC AGC TCT ACA GCT TCC TGG AGC GCC
GGG ACG CAG CGT TGG TCC TTG TCG AGA TGT CGA AGG ACC TCG CGG
                              AluI      AluI
                   100                 110                 120                 130
ACT CGC CCT ACT TCC GCA GCC ACA GTG CGC AGA TTA GGA GCG CCA
TGA GCG GGA TGA AGG CGT CGG TGT CAC GCG TCT AAT CCT CGC GGT

        140                 150                 160                 170                 180
CTT CTT TTT GTC ACT TGA AAA ACA TGT AAA AAT AAT GTA CTA GGA
GAA GAA AAA CAG TGA ACT TTT TGT ACA TTT TTA TTA CAT GAT CCT

                   190                 200                 210                 220
GAC ACT TTC AAT AAA GGC AAA TGT TTT TAT TTG TAC ACT CTC GGG
CTG TGA AGG TTA TTT CCG TTT ACA AAA ATA AAC ATG TGA GAG CCC
          Poly(A)                       Poly(A)                       AvaI
           23kD                          DBP
        230                 240                 250                 260                 270
TGA TTA TTT ACC CCC CAC CCT TGC CGT CTG CGC CGT TTA AAA ATC
ACT AAT AAA TGG GGG GTG GGA ACG GCA GAC GCG GCA AAT TTT TAG
HphI----------
                   280                 290                 300                 310
AAA GGG GTT CTG CCG CGC ATC GCT ATG CGC CAC TGG CAG GGA CAC
TTT CCC CAA GAC GGC GCG TAG CGA TAC GCG GTG ACC GTC CCT GTG

        320                 330                 340                 350                 360
GTT GCG ATA CTG GTG TTT AGT GCT CCA CTT AAA CTC AGG CAC AAC
CAA CGC TAT GAC CAC AAA TCA CGA GGT GAA TTT GAG TCC GTG TTG

                   370                 380                 390                 400
CAT CCG CGG CAG CTC GGT GAA GTT TTC ACT CCA CAG GCT GCG CAC
GTA GGC GCC GTC GAG CCA CTT CAA AAG TGA GGT GTC CGA CGC GTG
             AluI
        410                 420                 430                 440                 450
CAT CAC CAA CGC GTT TAG CAG GTC GGG CGC CGA TAT CTT GAA GTC
GTA GTG GTT GCG CAA ATC GTC CAG CCC GCG GCT ATA GAA CTT CAG

                   460                 470                 480                 490
GCA GTT GGG GCC TCC GCC CTG CGC GCG CGA GTT GCG ATA CAC AGG
CGT CAA CCC CGG AGG CGG GAC GCG CGC GCT CAA CGC TAT GTG TCC
          HaeIII
```

Abb. 18: Nukleotidsequenz der Ad2 DNA Region zwischen den Koordinaten 61,35 und 66,75. Nukleotid 1 ist das erste Nukleotid der Erkennungssequenz von HpaII bei der Position 61,35. Die Poly(A)-Additionssignale für die DBP mRNA und für die 23 kD-Protein bzw. Hexon mRNA sind unterstrichen. Die Erkennungssequenzen der Endonukleasen, die von der Gesamtkartierung des Ad2 Genoms, von der Kartierung des BglII J- und des EcoRI B/BglII C-Fragments und von der Sequenzierungsstrategie her bekannt waren, sind unterstrichen und mit dem Namen der Endonuklease versehen.

```
          500         510         520         530         540
5'l-GTT GCA GCA CTG GAA CAC TAT CAG CGC CGG GTG GTG CAC GCT GGC
3'r-CAA CGT CGT GAC CTT GTG ATA GTC GCG GCC CAC CAC GTG CGA CCG
                                  HaeII                 HaeIII
                                     HpaII             BalI
                550         560         570         580
    CAG CAC GCT CTT GTC GGA GAT CAG ATC CGC GTC CAG GTC CTC CGC
    GTC GTG CGA GAA CAG CCT CTA GTC TAG GCG CAG GTC CAG GAG GCG

          590         600         610         620         630
    GTT GCT CAG GGC GAA CGG AGT CAA CTT TGG TAG CTG CCT TCC CAA
    CAA CGA GTC CCG CTT GCC TCA GTT GAA ACC ATC GAC GGA AGG GTT
                          HinfI             AluI
                            HincII
                640         650         660         670
    AAA GGG TGC ATG CCC AGG CTT TGA GTT GCA CTC GCA CCG TAG TGG
    TTT CCC ACG TAC GGG TCC GAA ACT CAA CGT GAG CGT GGC ATC ACC

          680         690         700         710         720
    CAT CAG AAG GTG ACC GTG CCC GGT CTG GGC GTT AGG ATA CAG CGC
    GTA GTC TTC CAC TGG CAC GGG CCA GAC CCG CAA TCC TAT GTC GCG
                            HpaII
                730         740         750         760
    CTG CAT GAA AGC CTT GAT CTG CTT AAA AGC CAC CTG AGC CTT TGC
    GAC GTA CTT TCG GAA CTA GAC GAA TTT TCG GTG GAC TCG GAA ACG

          770         780         790         800         810
    GCC TTC AGA GAA GAA CAT GCC GCA AGA CTT GCC GGA AAA CTG ATT
    CGG AAG TCT CTT CTT GTA CGG CGT TCT GAA CGG CCT TTT GAC TAA
                                              HpaII
                820         830         840         850
    GGC CGG ACA GGC CGC GTC ATG CAC GCA GCA CCT TGC GTC GGT GTT
    CCG GCC TGT CCG GCG CAG TAC GTG CGT CGT GGA ACG CAG CCA CAA
    HaeIII      HaeIII
      HpaII
          860         870         880         890         900
    GGA GAT CTG CAC CAC ATT TCG GCC CCA CCG GTT CTT CAC GAT CTT
    CCT CTA GAC GTG GTG TAA AGC CGG GGT GGC CAA GAA GTG CTA GAA
       BglII                  HaeIII      HpaII
                              Sau96I
                910         920         930         940
    GGC CTT GCT AGA CTG CTC CTT CAG CGC GCG CTG CCC GTT TTC GCT
    CCG GAA CGA TCT GAC GAG GAA GTC GCG CGC GAC GGG CAA AAG CGA
    HaeIII
          950         960         970         980         990
    CGT CAC ATC CAT TTC AAT CAC GTG CTC CTT ATT TAT CAT AAT GCT
    GCA GTG TAG GTA AAG TTA GTG CAC GAG GAA TAA ATA GTA TTA CGA

                1000        1010        1020        1030
    CCC GTG TAG ACA CTT AAG CTC GCC TTC GAT CTC AGC GCA GCG GTG
    GGG CAC ATC TGT GAA TTC GAG CGG AAG CTA GAG TCG CGT CGC CAC
                          AluI
          1040        1050        1060        1070        1080
    CAG CCA CAA CGC GCA GCC CGT GGG CTC GTG GTG CTT GTA GGT TAC
    GTC GGT GTT GCG CGT CGG GCA CCC GAG CAC CAC GAA CAT CCA ATG
```

Abb. 18, Fortsetzung

```
                1090          1100          1110          1120
5'1-CTC TGC AAA CGA CTG CAG GTA CGC CTG CAG GAA TCG CCC CAT CAT
3'r-GAG ACG TTT GCT GAC GTC CAT GCG GAC GTC CTT AGC GGG GTA GTA
                                           HinfI
     1130          1140          1150          1160          1170
CGT CAC AAA GGT CTT GTT GCT GGT GAA GGT CAG CTG CAA CCC GCG
GCA GTG TTT CCA GAA CAA CGA CCA CTT CCA GTC GAC GTT GGG CGC
                                     AluI
                1180          1190          1200          1210
GTG CTC CTC GTT TAG CCA GGT CTT GCA TAC GGC CGC CAG AGC TTC
CAC GAG GAG CAA ATC GGT CCA GAA CGT ATG CCG GCG GTC TCG AAG
                                     HaeIII        AluI
     1220          1230          1240          1250          1260
CAC TTG GTC AGG CAG TAG CTT GAA GTT TGC CTT TAG ATC GTT ATC
GTG AAC CAG TCC GTC ATC GAA CTT CAA ACG GAA ATC TAG CAA TAG
                      AluI
                1270          1280          1290          1300
CAC GTG GTA CTT GTC CAT CAA CGC GCG CGC AGC CTC CAT GCC CTT
GTG CAC CAT GAA CAG GTA GTT GCG CGC GCG TCG GAG GTA CGG GAA

     1310          1320          1330          1340          1350
CTC CCA CGC AGA CAC GAT CGG CAG GCT CAG CGG GTT TAT CAC CGT
GAG GGT GCG TCT GTG CTA GCC GTC CGA GTC GCC CAA ATA GTG GCA

                1360          1370          1380          1390
GCT TTC ACT TTC CGC TTC ACT GGA CTC TTC CTT TTC CTC TTG CGT
CGA AAG TGA AAG GCG AAG TGA CCT GAG AAG GAA AAG GAG AAC GCA
                                 HinfI
     1400          1410          1420          1430          1440
CCG CAT ACC CCG CGC CAC TGG GTC GTC TTC ATT CAG CCG CCG CAC
GGC GTA TGG GGC GCG GTG ACC CAG CAG AAG TAA GTC GGC GGC GTG

                1450          1460          1470          1480
CGT GCG CTT ACC TCC CTT GCC GTG CTT GAT TAG CAC CGG TGG GTT
GCA CGC GAA TGG AGG GAA CGG CAC GAA CTA ATC GTG GCC ACC CAA
                                                 HpaII
     1490          1500          1510          1520          1530
GCT GAA ACC CAC CAT TTG TAG CGC CAC ATC TTC TCT TTC TTC CTC
CGA CTT TGG GTG GTA AAC ATC GCG GTG TAG AAG AGA AAG AAG GAG

                1540          1550          1560          1570
GCT GTC CAC GAT CAC CTC TGG GGA TGG CGG GCG CTC GGG CTT GGG
CGA CAG GTG CTA GTG GAG ACC CCT ACC GCC CGC GAG CCC GAA CCC
                                              AvaI
     1580          1590          1600          1610          1620
AGA GGG GCG CTT CTT TTT CTT TTT GGA CGC AAT GGC CAA ATC CGC
TCT CCC CGC GAA GAA AAA GAA AAA CCT GCG TTA CCG GTT TAG GCG
                                           HaeIII
                                            BalI
                1630          1640          1650          1660
CGT CGA GGT CGA TGG CCG CGG GCT GGG TGT GCG CGG CAC CAG CGC
GCA GCT CCA GCT ACC GGC GCC CGA CCC ACA CGC GCC GTG GTC GCG
                  HaeIII
```

Abb. 18, Fortsetzung

```
        1670          1680          1690          1700          1710
5'l-ATC TTG TGA CGA GTC TTC TTC GTC CTC GGA CTC GAG ACG CCG CCT
3'r-TAG AAC ACT GCT CAG AAG AAG CAG GAG CCT GAG CTC TGC GGC GGA
                 HinfI                    HinfI
                                          XhoI(AvaI)
                1720          1730          1740          1750
    CAG CCG CTT TTT TGG GGG CGC GCG GGG AGG CGG CGG CGA CGG CGA
    GTC GGC GAA AAA ACC CCC GCG CGC CCC TCC GCC GCC GCT GCC GCT

        1760          1770          1780          1790          1800
    CGG GGA CGA CAC GTC CTC CAT GGT TGG TGG ACG TCG CGC CGC ACC
    GCC CCT GCT GTG CAG GAG GTA CCA ACC ACC TGC AGC GCG GCG TGG

                1810          1820          1830          1840
    GCG TCC GCG CTC GGG GGT GGT TTC GCG CTG CTC CTC TTC CCG ACT
    CGC AGG CGC GAG CCC CCA CCA AAG CGC GAC GAG GAG AAG GGC TGA
                 AvaI
        1850          1860          1870          1880          1890
    GGC CAT TTC CTT CTC CTA TAG GCA GAA AAA GAT CAT GGA GTC AGT
    CCG GTA AAG GAA GAG GAT ATC CGT CTT TTT CTA GTA CCT CAG TCA
  HaeIII                                                HinfI
   BalI
                1900          1910          1920          1929
    CGA GAA GGA GGA CAG CCT AAC CGC CCC CTT TGA GTT CGC
    GCT CTT CCT CCT GTC GGA TTG GCG GGG GAA ACT CAA GCG
```

Abb. 18, Schluß

Aus ganz praktischen Erwägungen ist die Nukleotidsequenz auch hier in einem Triplettraster, beginnend mit dem ersten Nukleotid der HpaII-Erkennungssequenz bei der Kartenposition 61,35, dargestellt worden: Das Ablesen in einem Triplettraster erlaubt ein fehlerfreies Übertragen der Information aus einem schriftlichen Medium in ein anderes, und die Erkennungssequenzen von Endonukleasen, die von der Kartierung und der Sequenzierungsstrategie her bekannt waren, können überschaubar abgebildet werden.

Vier der 116 in Tabelle 7 aufgeführten Sequenzgelautoradiogramme werden in den Abb. 19, 20, 21 und 22 zur Illustration von Teilsequenzen und zur Betrachtung der Aberrationen, die im Sequenzgelbandenmuster auftreten können, dargestellt.

Abb. 19 zeigt das Autoradiogramm eines 100% XC-Laufs des 5'1-BglII J/Hinf-2/HaeIII-2-Fragments auf einem 65 cm-Sequenzgel (Nr. 31 in Tabelle 7 und Abb. 17). Drei leichte, die Lesbarkeit der Sequenz aber nicht entscheidend mindernde Aberrationen sind zu erkennen:

a) In der G+A- bzw. C+T- und C-Leiter sind schwache Banden an Positionen vorhanden, wo Purine Pyrimidinen bzw. Pyrimidine Purinen in der Sequenz folgen. Die Ursache kann einerseits eine Reaktion von Hydrazin mit Purinen sein, wenn Hydrazin nach dem Reaktionsstop und vor allem bei der anschließenden Natriumacetatfällung, die den pH senkt, nicht ausreichend entfernt worden ist. Andererseits können die zusätzlichen Banden in der G+A-Leiter auf eine verstärkte Hydrolyse durch Ameisensäure 88% zurückzuführen sein, die dann auch zur Bildung des benachbarten Pyrimidinoligonukleotids führt.

b) Die Intensität der Banden in der G-Leiter nimmt mit wachsender Größe der Spaltprodukte ab. Der Grund hierfür dürfte in einer Übermethylierung des Guanins liegen.

c) Oberhalb der alle vier Sequenzleitern begrenzenden Endbande tritt eine weitere Bande auf. Diese ist auf Längenheterogenität zurückzuführen, die, wie der Blick in die Nukleotidsequenz bei den Positionen 812 und 821 zeigt (Abb. 18), auf zwei eng benachbarten HaeIII-Schnittstellen beruht, wovon eine bevorzugt erkannt und geschnitten wird.

Die Erkennungssequenzen einiger Endonukleasen in dieser Region sind gekennzeichnet. Es wird augenfällig, daß die Sequenzen für NciI und BstEII Extensionen derjenigen für HpaII und HphI sind. Viele Endonukleasen teilen sich solche Kernbereichssequenzen mit anderen Enzymspecies. Ad2 DNA besitzt 8 Schnittstellen für BstEII, von denen allein 2 im codierenden Teil des DBP-Gens zu finden sind (s. III.2.).

Das Autoradiogramm eines 33% XC-Laufs des 5'1-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-1-Fragments auf einem 65 cm-Sequenzgel (Nr. 34 in Tab. 7 und Abb. 17) zeigt eine Aberration, die bei der Sequenzierung sehr langer Fragmente auftreten kann (EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-1 hat 706 bp). Der Pfeil links in Abb. 20 bezeichnet eine Stelle der Bandenabstandsspreizung, die entsteht, wenn endmarkierte Spaltprodukte lang genug werden, um sich in eine stabile "hairpin"-Konfiguration zu falten. Dieser sog. Kompressionseffekt (Brown und Smith, 1977) führt zu einem anomalen Lauf im Gel.

Neben den Erkennungssequenzen einiger Endonukleasen ist eine Region gekennzeichnet, in der 3 CpG-Dinukleotide aufeinanderfolgen. Auf die Bedeutung dieses "CG-Clusters" wird in Abschnitt III.1. eingegangen.

Ein 33% XC-Lauf des 5'r-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-4-Fragments auf einem 65 cm-Sequenzgel erlaubt es, die Sequenz von der Position 1697 bis 1580 zu lesen (Nr. 55 in Tab. 7 und Abb. 17). Kurz unterhalb der Geltaschen muß eine Diskontinuität in der Gelmatrix vorgelegen haben: Sie führte zu zusätzlichen verzogenen Banden (Abb. 21).

Drei Erkennungssequenzen der Endonukleasen MboII und HinfI sowie die Sequenzen für SacII und HaeIII überlappen sich. Im Falle von SacII und HaeIII stellt die Überlappungszone CGCG wiederum eine Erkennungssequenz für FnuDII dar. Auch in der Sequenz für Fnu4HI beginnt mit dem 3. Nukleotid eine CGCG-Sequenz.

Abb. 22 schließlich zeigt das Autoradiogramm eines 33% XC-Laufs des 5'r-BglII J/HinfI-2/AluI-3-Fragments auf einem 65 cm-Sequenzgel (Nr. 78 in Tab. 7 und Abb. 17). Es ist zu erkennen, daß es Regionen im proteincodierenden Teil des DBP-Gens gibt, in denen sich Endonuklease-Erkennungssequenzen

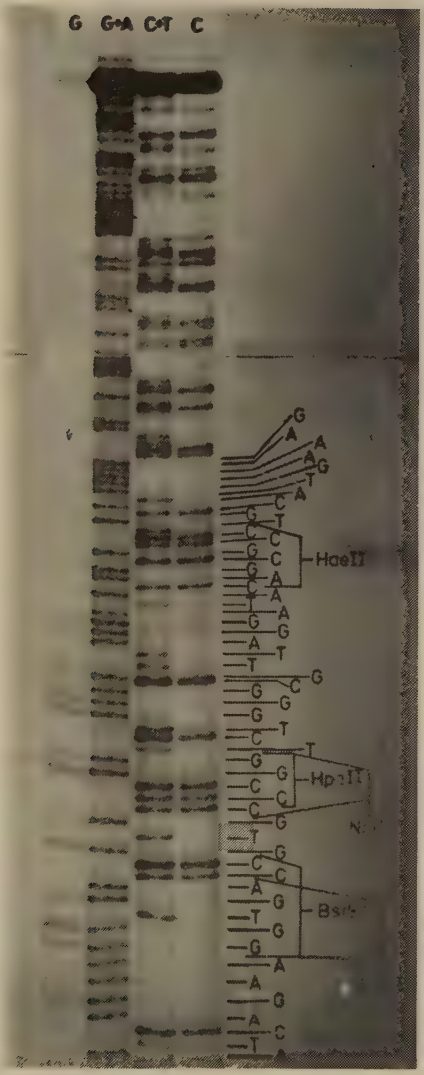


Abb. 19: Sequenzgelautoradigramm eines 100% XC-Laufs des 5'1-BglII J/HinfI-2/HaeIII-2-Fragments auf einem 65 cm-Gel
(Nr. 31 in Tabelle 7 und Abbildung 17)
Erläuterung s. Text

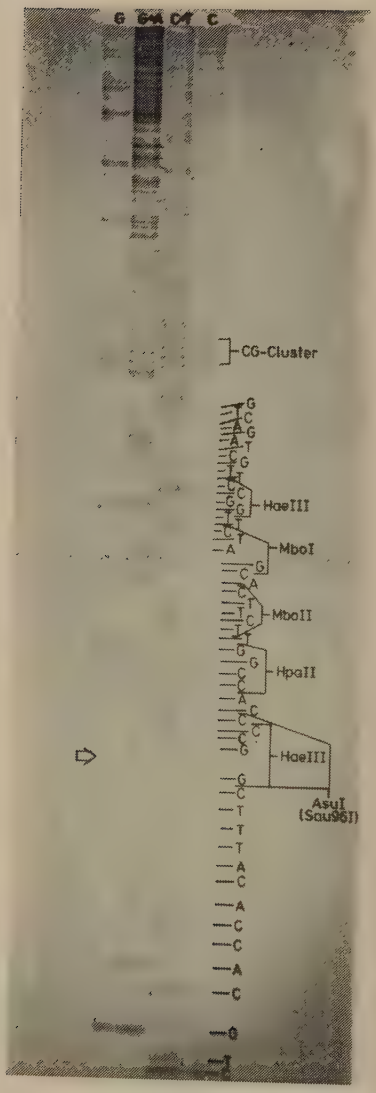


Abb. 20: Sequenzgelautoradiogramm eines 33% XC-Laufs des 5'1-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-1-Fragments auf einem 65 cm-Gel

(Nr. 34 in Tabelle 7 und Abbildung 17)

Erläuterung s. Text

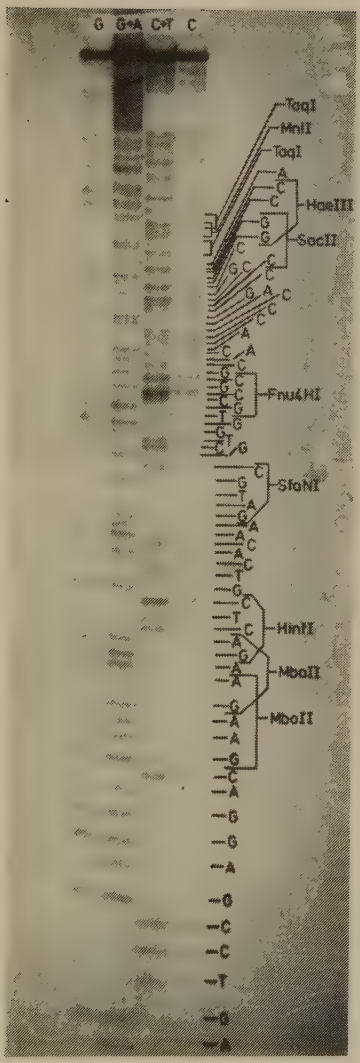


Abb. 21: Sequenzgelautoradiogramm eines 33% XC-Laufs des 5'r-EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-4-Fragments auf einem 65 cm-Gel
(Nr. 55 in Tabelle 7 und Abbildung 17)
Erläuterung s. Text

Abb. 22: Sequenzgelautoradiogramm eines 33% XC-Laufs des 5'r-BglII J/HinfI-2/AluI-3-Fragments auf einem 65 cm-Gel

(Nr. 78 in Tabelle 7 und Abbildung 17)
Erläuterung s. Text

so stark häufen, daß sie ineinandergeschachtelt sind.

Ad2 DNA besitzt 12 Sequenzen für die Endonuklease BglI, die die allgemeine Sequenz GCCNNNN'NGGC erkennt. In diesem Fall lautet die Sequenz GCCTGTC'CGGC. Darin ist die Erkennungssequenz CCGG für HpaII enthalten. Außerdem befindet sich vor und nach der BglI-Sequenz ein Guanin bzw. Cytosin, so daß sich nochmals zwei Erkennungssequenzen für HaeIII ergeben.

III. Sequenzanalyse

Die Sequenz des Ad2 DBP-Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des DBP besitzen einige besondere Charakteristika, deren Wertung über die Stellung des Ad2 DBP-Gens in dem großen Pool eukaryotischer Gene Auskunft gibt und die im Fall des DBP selbst mit seiner Funktion als DNA-bindendes Protein in Zusammenhang gebracht wurden.

Durch die große Frequenz von CpG- und auch GpC-Dinukleotiden im Ad2 DBP-Gen ist dieses sehr reich an Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen: Insgesamt waren 272 verschiedene Schnittstellen nachzuweisen.

Nach der Auffindung des Leserasters für das DBP-Gen waren die CpG-Dinukleotide enthaltenden Triplettcodons ebenfalls recht häufig: 89 der 529 Aminosäuren des DBP werden von solchen Tripletts codiert, unter anderem ist die Prolinhäufigkeit im DBP auf das 13malige Auftreten des CCG-Codons zurückzuführen.

Die mit diesen Charakteristika verbundenen Ergebnisse sollen nun im einzelnen vorgestellt werden.

1. Der G+C-Gehalt, das Vorkommen des CpG-Nachbarpaares und die Häufigkeit von FnuDII- und HhaI-Erkennungssequenzen im Ad2 DBP-Gen

Die DNAs humaner Adenoviren der Untergruppe C (Serotypen 1, 2, 5 und 6) haben einen G+C-Gehalt von 57 - 59%. Das Ad2 DBP-Gen besitzt mit 58,16% G+C einen typischen Wert für diese Untergruppe.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines der 16 möglichen Dinukleotide in DNA beträgt p = 0,0625, d.h. bei einer vollkommenen Gleichverteilung der Nachbarpaare wären das 6,25% für jedes Dinukleotid in einer gegebenen DNA. Die Analyse des Ad2 DBP Gens ergab, daß 160 CpG-Dinukleotide in der sequenzierten Region vorkommen, das sind 16,59% der 1929 bp langen Sequenz. Diese Häufung des CpG-Paares steht im Kontrast zu den Resultaten der Untersuchung von Russell et al. (1976), die besagt, daß eukaryotische DNA generell defizient im Auftreten des CpG-Paares ist.

Diese Diskrepanz erlaubt zwei Folgerungen: Das Ad2 DBP-Gen verhält sich nicht wie ein typisches eukaryotisches Gen oder das Russell et al. vorgelegene Datenmaterial ließ diesen allgemeinen Schluß nicht zu. Die Untersuchungen von Russell et al. wurden wiederum gestützt, nachdem Fiers et al. (1978) die komplette Nukleotidsequenz der DNA des Papovavirus SV40 aufgestellt hatten: Das CpG-Dinukletid ist nur zu o,5% vertreten.

Im Ad2 DBP-Gen tritt das CpG-Paar sogar 19mal repetitiv geclustert auf, 15mal als CGCG-Sequenz, 2mal als CGCGCG-Sequenz und 2mal als CGCGCGCG-Sequenz. CGCG ist aber auch die Erkennungssequenz für die Endonuklease FnuDII, die in dieser Sequenz hinter dem 2. Nukleotid (G) schneidet. FnuDII wird mit hoher Wahrscheinlichkeit alle CGCG-Sequenzen erkennen und auch dort schneiden, weniger wahrscheinlich scheint zu sein, daß CGCGCG tatsächlich 2mal und CGCGCGCG 3mal geschnitten wird, da jeweils nur wieder CpG herausgeschnitten werden kann, und FnuDII nach Besetzung einer CGCG-Sequenz nur einmal seine katalytische Aktivität entfalten wird.

Die Umkehrung der CGCG-Sequenz ist die Sequenz GCGC. Diese Sequenz wird von der Endonuklease HhaI erkannt, die hinter dem 3. Nukleotid (G) schneidet. Diese Sequenz tritt einzeln 22mal, als GCGCGC 1mal und als GCGCGCGC 3mal im Ad2 DBP-Gen auf. In Tabelle 8 sind alle Erkennungssequenzen von FnuDII und HhaI aufgeführt.

FnuDII		HhaI	
Position des Nukleotids vor der dem Schnitt	Position Erkennungs-sequenz	Position des Nukleotids vor der dem Schnitt	Position Erkennungs-sequenz
285	284-287	88	86-89
366	365-368	119	117-120
416	415-418	132	130-133
473	472-475	257	255-258
475	474-477	287	285-288
477	476-479	299	297-300
569	568-571	402	400-403
584	583-586	434	432-435
824	823-826	473	471-474
926	925-928	475	473-476
928	927-930	477	475-478
1046	1045-1048	521	519-522
1168	1167-1170	719	717-720
1283	1282-1285	766	764-767
1285	1284-1287	926	924-927
1287	1286-1289	928	926-929
1407	1406-1409	930	928-931
1638	1637-1640	1027	1025-1028
1653	1652-1655	1048	1046-1049
1730	1729-1732	1285	1283-1286
1732	1731-1734	1287	1285-1288
1791	1790-1793	1289	1287-1290
1801	1800-1803	1409	1407-1410
1807	1806-1809	1446	1444-1447
1825	1824-1827	1508	1506-1509
		1563	1561-1564
		1584	1582-1585
		1653	1651-1654
		1664	1662-1665
		1730	1728-1731
		1732	1730-1733
		1809	1807-1810
		1827	1825-1828

Tabelle 8: FnuDII- und HhaI-Erkennungssequenzen in der sequenzierten Region des Ad2 DBP-Gens
Die einem Cluster angehörigen Sequenzen sind unterstrichen.

Bei einer Zufallsverteilung der Nukleotidpaare folgt die erwartete Frequenz a von einer Restriktions-Erkennungssequenz mit r Nukleotidpaaren innerhalb einer Sequenz mit m_T Nukleotidpaaren und einem G+C-Gehalt von g der Poissonverteilung gemäß der von Nei und Li (1979) angegebenen Formel:

$$a = \left(\frac{g}{2}\right)^{r_1} \left[\frac{(1-g)}{2}\right]^{r_2}$$

mit r_1 = Anzahl G+C in der Erkennungssequenz und
r_2 = Anzahl A+T in der Erkennungssequenz.

In der proteincodierenden Region des Ad2 DBP-Gens mit g = 0,58 und m_T = 1929 beträgt die erwartete Anzahl $m_T a$ der Sequenz CGCG oder GCGC (r_1 = 4; r_2 = 0) 14. Nach den Angaben von Roberts (1980) besitzt Ad2 DNA mehr als 50 Erkennungssequenzen für FnuDII und HhaI. Die sequenzierte Region des Ad2 DBP-Gens nimmt 5,4% des Ad2 Genoms ein; mithin kann das gesamte Ad2 Genom über 200 CGCG- oder GCGC-Sequenzen enthalten.

Die FnuDII- bzw. HhaI-Erkennungssequenzen erscheinen aber tatsächlich 25- bzw. 33mal im Ad2 DBP-Gen. Sie scheinen also keinesfalls zufallsverteilt zu sein. Um zu überprüfen, ob sich diese Häufung spezifisch im Ad2 DBP-Gen findet, wurde die Frequenz des Auftretens des CpG-Dinukleotids und der CGCG-Sequenz für FnuDII in anderen bereits sequenzierten Regionen des Ad2 Genoms untersucht:

a) Akusjärvi et al. (1980) sequenzierten eine 551 bp lange Region bei den Kartenpositionen 29 - 30, die für die VA RNAs codiert. Sie enthält 59 CpG-Paare, das sind 21,41% dieser Sequenz. Darin sind 3 einfache FnuDII-Sequenzen und ein CGCGCGCG-Cluster enthalten. 4 CGCG-Sequenzen waren zu erwarten gewesen.

b) Die 606 bp lange, für das Strukturprotein IX codierende Region (Aleström et al., 1980) besitzt 35 CpG-Paare, das sind immer noch 11,55% dieser Sequenz. In ihr treten 3 einfache FnuDII-Sequenzen und ein CGCGCGCG-Cluster auf. Auch hier waren 4 CGCG-Sequenzen zu erwarten.

c) Bei der Kartenposition 99,1 sequenzierten Hashimoto et al. (1981) eine 160 bp lange Region, in der die 5'-Kappenstrukturen für mRNAs der frühen Region 4 codiert werden. Mit 7 CpG-Paaren und keiner FnuDII-Sequenz liegt der CpG--Gehalt bei 8,75%. Nach der Statistik sollte eine FnuDII--Sequenz vorhanden sein.

d) In dem von Hérissé et al. (1980) sequenzierten EcoRI D--Fragment, Kartenposition 75,9 - 84,0, mit 2678 bp kommen 127 CpG-Paare, entsprechend 9,48% vor. Darunter befinden sich 6 einfache FnuDII-Sequenzen, aber es wären 19 zu erwarten gewesen.

e) Das EcoRI F-Fragment, Kartenpositionen 70,7 - 75,9, sequenziert von Galibert et al. (1979), enthält bei 1743 bp Länge 132 CpG-Paare ≙ 15,14%, und 10 FnuDII-Sequenzen. 12 CGCG-Sequenzen wären es bei statistischer Verteilung gewesen.

f) Akusjärvi et al. (1981) sequenzierten 622 unmittelbar links von der in dieser Arbeit beginnenden Sequenz gelegene Nukleotidpaare von der BamHI-Schnittstelle bei 59,5 bis zum HpaII-Schnitt bei der Position 61,35. Die Region enthält 36 CpG-Paare ≙ 11,5% mit 3 FnuDII-Sequenzen, wobei 4 CGCG--Sequenzen zu erwarten waren.

In diesen über das gesamte Ad2 Genom verteilten Sequenzen wird die im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens vorhandene CGCG-Häufigkeit nicht erreicht, und die Frequenz des CpG-Dinukleotids ist nur im Fall des VA RNA-Gens höher.

Es stellt sich die Frage, ob auf Grund dieser Resultate dem Ad2 DBP-Gen eine Sonderstellung innerhalb des Systems adenoviraler Gene eingeräumt werden muß.

2. Die Erkennungssequenzen der weiteren Restriktionsendonukleasen des Typs II im Ad2 DBP-Gen

Auch das Auftreten und die Häufigkeit weiterer CG- oder GC-reicher Erkennungssequenzen spiegelt die molekulare Organisation des Ad2 DBP-Gens wider. In Tabelle 9 sind sämtliche weiteren im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens gefun-

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz	Position der Erkennungs-sequenz
1	HpaII	C'CGG	1-4
2	NciI	CC'GGG	1-5
7	RsaI	GT'AC	6-9
9	KpnI	GGTAC'C	5-10
31	EcoRII	'CCAGG	32-36
33	ApyI	CC'AGG	32-36
34	HgaI	GCGTC-16 bp	50-54
37	RsaI	GT'AC	36-39
58	EcoRII	'CCAGG	59-63
60	ApyI	CC'AGG	59-63
68	AluI	AG'CT	67-70
76	AluI	AG'CT	75-78
79	EcoRII	'CCTGG	80-84
81	ApyI	CC'TGG	80-84
89	HaeII	AGCGC'C	85-90
106	BbvI	GCAGC	106-110
107	Fnu4HI	GC'AGC	106-110
118	AosI	TGC'GCA	116-121
133	HaeII	AGCGC'C	129-134
173	RsaI	GT'AC	172-175
214	RsaI	GT'AC	213-216
220	AvaI	C'TCGGG	220-225
236	HphI	GGTGA+ 8 bp	224-228
283	Fnu4HI	GC'CGC	282-286
287	SfaNI	GCATC	287-291
314	SacIII	ACGT	314-317
339	HgiAI	GTGCT'C	335-340
349	DdeI	C'TCAG	349-353
367	SacII	CCGC'GG	364-369
367	Fnu4HI	GC'GGC	366-370
369	BbvI	GCAGC	369-373
370	Fnu4HI	GC'AGC	369-373
372	AluI	AG'CT	371-374
395	HphI	TCACC-13 bp	408-412
397	BbvI	GCTGC	397-401
398	Fnu4HI	GC'TGC	397-401
401	AosI	TGC'GCA	399-404
432	AcyI	GG'CGCC	431-436
435	HaeII	GGCGC'C	431-436
441	EcoRV	GATAT'C	437-442
458	AsuI	G'GGCC	458-462
460	HaeIII	GG'CC	459-462
470	MnlI	CCTC+ 6 bp	461-464
499	BbvI	GCAGC	499-503

Tabelle 9: Klassifikation von Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen nach ihrer Anordnung in der sequenzierten Ad2 DNA Region

Legende s. letzte Seite der Tabelle

Tabelle 9, Fortsetzung:

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz	Position der Erkennungs-sequenz
500	Fnu4HI	GC'AGC	499-503
522	HpaII	C'CGG	522-525
522	HaeII	AGCGC'C	518-523
523	NciI	CC'GGG	522-526
533	HgiAI	GTGCA'C	529-534
539	HaeIII	GG'CC	538-541
539	BalI	TGG'CCA	537-542
539	HaeI	TGG'CAA	537-542
553	HgaI	GCGTC-16 bp	569-573
558	MboI	'GATC	559-562
563	MboI	'GATC	564-567
563	XhoII	A'GATCC	563-568
565	EcoRI'	AGA'TCC	563-568
572	EcoRII	'CCAGG	573-577
574	ApyI	CC'AGG	573-577
576	AvaII	G'GTCC	576-580
576	AsuI	G'GTCC	576-580
588	MnlI	CCTC+ 6 bp	579-582
590	DdeI	C'TCAG	590-594
603	HinfI	G'AGTC	603-607
607	HincII	GTC'AAC	605-610
618	AluI	AG'CT	617-620
618	BbvI	GCTGC	618-622
619	Fnu4HI	GC'TGC	618-622
642	SphI	GCATG'C	638-643
643	EcoRII	'CCAGG	644-648
645	ApyI	CC'AGG	644-648
675	SfaNI	GCATC	675-679
684	BstEII	G'GTGACC	684-690
695	HpaII	C'CGG	695-698
695	NciI	CC'CGG	694-698
696	HphI	GGTGA+ 8 bp	684-688
720	HaeII	AGCGC'C	716-721
735	MboI	'GATC	736-739
754	DdeI	C'TGAG	754-758
785	Fnu4HI	GC'CGC	784-788
787	MboII	GAAGA+ 8 bp	775-779
797	HpaII	C'CGG	797-800
808	HgaI	GCGTC-16 bp	824-828
812	HaeIII	GG'CC	811-814
813	HpaII	C'CGG	813-816
818	BglI	GCCGGAC'AGGC	812-822
821	HaeIII	GG'CC	820-823
822	Fnu4HI	GC'CGC	821-825
829	HgaI	GCGTC-16 bp	845-849
835	BbvI	GCAGC	835-839
836	Fnu4HI	GC'AGC	835-839
858	BglII	A'GATCT	858-863
858	XhoII	A'GATCT	858-863

Tabelle 9, Fortsetzung:

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz	Position der Erkennungs-sequenz
858	MboI	'GATC	859-862
860	EcoRI'	AGA'TCT	858-863
875	MboII	TCTTC-13 bp	888-892
876	AsuI	G'GCCC	876-880
877	HaeIII	GG'CC	876-879
883	HpaII	C'CGG	883-886
894	MboI	'GATC	895-898
902	HaeIII	GG'CC	901-904
902	HaeI	TGG'CCT	900-905
930	BbvI	GCTGC	930-934
931	Fnu4HI	GC'TGC	930-931
965	SacIII	ACGT	965-968
971	HgiAI	GTGCT'C	967-972
997	AccI	GT'AGAC	996-1001
1008	AluI	AG'CT	1007-1010
1016	TaqI	T'CGA	1016-1019
1017	MboI	'GATC	1018-1021
1021	DdeI	C'TCAG	1021-1025
1027	BbvI	GCAGC	1027-1031
1028	Fnu4HI	GC'AGC	1027-1031
1035	BbvI	GCAGC	1035-1039
1036	Fnu4HI	GC'AGC	1035-1039
1048	BbvI	GCAGC	1048-1052
1049	Fnu4HI	GC'AGC	1048-1052
1075	BstEII	G'GTTACC	1075-1081
1089	MnlI	CCTC+ 6 bp	1080-1083
1097	PstI	CTGCA'G	1093-1098
1100	RsaI	GT'AC	1099-1102
1109	PstI	CTGCA'G	1105-1110
1111	HinfI	G'AATC	1111-1115
1158	AluI	AG'CT	1157-1160
1158	BbvI	GCTGC	1158-1162
1158	PvuII	CAG'CTG	1156-1161
1159	Fnu4HI	GC'TGC	1158-1162
1169	SacII	CCGC'GG	1166-1171
1185	EcoRII	'CCAGG	1186-1190
1185	MnlI	CCTC+ 6 bp	1176-1179
1187	ApyI	CC'AGG	1186-1190
1200	XmaIII	C'GGCCG	1200-1205
1202	HaeIII	GG'CC	1201-1204
1203	Fnu4HI	GC'CGC	1202-1206
1211	AluI	AG'CT	1210-1213
1233	AluI	AG'CT	1232-1235
1250	MboI	'GATC	1251-1254
1262	SacIII	ACGT	1262-1265
1268	RsaI	GT'AC	1267-1270
1289	BbvI	GCAGC	1289-1293

Tabelle 9, Fortsetzung:

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz	Position der Erkennungs-sequenz
1290	Fnu4HI	GC'AGC	1289-1293
1302	MnlI	CCTC+ 6 bp	1293-1296
1319	PvuI	'CGATCG	1320-1325
1320	MboI	'GATC	1321-1324
1323	RshI	CGAT'CG	1320-1325
1324	XorII	CGATC'G	1320-1325
1331	DdeI	C'TCAG	1331-1335
1331	HphI	TCACC-13 bp	1344-1348
1363	MboII	TCTTC-13 bp	1376-1380
1373	HinfI	G'ACTC	1373-1377
1376	HgaI	GCGTC-16 bp	1392-1396
1395	MnlI	CCTC+ 9 bp	1386-1389
1408	MboII	TCTTC-13 bp	1421-1425
1435	Fnu4HI	GC'CGC	1434-1438
1460	MnlI	CCTC+ 6 bp	1451-1454
1476	HpaII	C'CGG	1476-1479
1504	MboII	TCTTC-13 bp	1514-1518
1509	HaeII	AGCGC'C	1505-1510
1510	MboII	TCTTC-13 bp	1523-1527
1529	HphI	TCACC-13 bp	1542-1546
1536	MnlI	CCTC+ 6 bp	1527-1530
1539	MboI	'GATC	1540-1543
1554	MnlI	CCTC+ 6 bp	1545-1548
1562	MnlI	GAGG-15 bp	1577-1580
1564	AvaI	C'TCGGG	1564-1569
1564	HaeII	GGCGC'T	1560-1565
1585	HaeII	GGCGC'T	1581-1586
1610	HaeIII	GG'CC	1609-1612
1610	BalI	TGG'CCA	1608-1613
1610	HaeI	TGG'CCA	1608-1613
1610	HgaI	GACGC+ 5 bp	1601-1605
1610	MnlI	GAGG-15 bp	1625-1628
1615	EcoRI'	AAA'TCC	1613-1618
1623	TaqI	T'CGA	1623-1626
1629	TaqI	T'CGA	1629-1632
1635	HaeIII	GG'CC	1634-1637
1636	Fnu4HI	GC'CGC	1635-1639
1639	SacII	CCGC'GG	1636-1641
1654	Fnu4HI	GC'GGC	1653-1657
1664	SfaNI	GCATC	1664-1668
1666	MboII	TCTTC-13 bp	1679-1683
1669	MboII	TCTTC-13 bp	1682-1686
1676	HinfI	G'AGTC	1676-1680
1694	HinfI	G'ACTC	1694-1698
1696	XhoI	C'TCGAG	1696-1701
1696	AvaI	C'TCGAG	1696-1701

Tabelle 9, Fortsetzung:

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz	Position der Erkennungs-sequenz
1697	TaqI	T'CGA	1697-1700
1698	MnlI	CCTC+ 6 bp	1689-1692
1702	AcyI	GA'CGCC	1701-1706
1709	DdeI	C'TCAG	1709-1713
1710	HgaI	GACGC+ 5 bp	1701-1705
1714	Fnu4HI	GC'CGC	1713-1717
1717	MnlI	CCTC+ 6 bp	1708-1711
1722	MnlI	GAGG-15 bp	1737-1740
1744	Fnu4HI	GC'GGC	1743-1747
1766	SacIII	ACGT	1766-1769
1774	NcoI	CC'ATGG	1773-1778
1779	MnlI	CCTC+ 6 bp	1770-1773
1785	HgaI	GCGTC-16 bp	1801-1805
1786	SacIII	ACGT	1786-1789
1786	AcyI	GA'CGTC	1785-1790
1794	Fnu4HI	GC'CGC	1793-1797
1810	AvaI	C'TCGGG	1810-1815
1822	MboII	TCTTC-13 bp	1835-1839
1827	BbvI	GCTGC	1827-1831
1828	Fnu4HI	GC'TGC	1827-1831
1842	MnlI	CCTC+ 6 bp	1833-1836
1847	HaeIII	GG'CC	1846-1849
1847	BalI	TGG'CCA	1845-1850
1847	HaeI	TGG'CCA	1845-1850
1875	MboI	'GATC	1876-1879
1883	MnlI	GAGG-15 bp	1898-1901
1883	HinfI	G'AGTC	1883-1887
1890	TaqI	T'CGA	1890-1893

Legende:

1. Für eine bestimmte Sequenz sind jeweils nur die Prototypen, d.h. die zuerst isolierten Typen, angegeben. Echte Isoschizomere von diesen Prototypen, d.h. Enzyme, die in der gleichen Sequenz an gleicher Position schneiden, sind nicht aufgeführt. Dagegen sind jene Endonukleasen aufgeführt, die in der gleichen Sequenz an verschiedener Position schneiden.
2. Alle Erkennungssequenzen sind auf dem 1-Strang in 5'→ 3'--Richtung zu lesen.
3. Die Schnittstellen werden mit Apostroph gekennzeichnet. Für die Enzyme, deren Schnittstellen noch unbekannt sind, wird die Position des ersten Nukleotids der Erkennungssequenz angegeben.

denen Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen aufgeführt.

Bei den Nukleotidpositionen 2, 523 und 695 treten die Sequenzen CCGGG und CCCGG für die Endonuklease NciI auf, die von Watson et al. (1980) beschrieben wurde. Von Kholmina et al. (1980) ist EcoRV isoliert worden, deren Erkennungssequenz GATATC im Ad2 DBP-Gen bei der Position 441 zu finden ist. Über eine Erkennungssequenz von EcoRV im Ad2 Genom lag bisher keine Information vor. Nach bisher unpublizierten Arbeiten von Langdale, Jiang, Myers und Roberts erkennt die neu isolierte Endonuklease NcoI die Sequenz CCATGG. Diese Sequenz tritt einmal bei der Position 1774 auf.

In Tabelle 9 sind auch die Positionen der Sequenz ACGT aufgenommen worden: Nach den Angaben von Tooze (1980) ist dies die Erkennungssequenz von SacIII und SstIII, die Ad2 DNA häufiger als 100mal schneiden sollen (Goff und Rambach, 1978). Sie kommt bei den Nukleotidpositionen 314, 965, 1262, 1766 und 1786 vor. Die Position des Schnitts ist noch unbekannt.

Die Tabelle 9 soll auch als Hilsmittel für kommende Arbeiten am Ad2 DBP-Gen dienen, da Rekombinantentechniken die gezielte Einführung von Mutationen im Ad2 DBP-Gen erlauben. Die nach der Genexpression im DBP entstehenden Defekte können zur Klärung der Funktion des DBP beitragen. Von den 47 prototypischen das Ad2 DBP-Gen schneidenden Endonukleasen sind in diesem Zusammenhang jene von Bedeutung, die jeweils nur eine Schnittstelle haben:

Position des Nukleotids vor dem Schnitt	Endonuklease	Erkennungssequenz
9	KpnI	GGTAC'C
441	EcoRV	GATAT'C
576	AvaII	G'GTCC
607	HincII	GTC'AAC
642	SphI	GCATG'C
818	BglI	GCCGGAC'AGGC
858	BglII	A'GATCT
997	AccI	GT'AGAC
1158	PvuII	CAG'CTG
1200	XmaIII	C'GGCCG
1319	PvuI	'CGATCG
1323	RshI	CGAT'CG
1324	XorII	CGATC'G
1696	XhoI	C'TCGAG
1774	NcoI	CC'ATGG

AosI (118, 401), XhoII (563, 858), BstEII (684, 1075) und PstI (1097, 1109) besitzen jeweils 2 Erkennungssequenzen.

Ihre Sequenz erkennen jeweils 3mal NciI (2, 523, 695), HgiAI (339, 533, 971), BalI (539, 1610, 1847), EcoRI' (565, 860, 1615), AsuI (458, 576, 876), SacII (367, 1169, 1639), AcyI (432, 1702, 1786) und SfaNI (287, 675, 1664).

Mit 4 Erkennungssequenzen sind vertreten AvaI (220, 1564, 1696, 1810) und HaeI (539, 902, 1610, 1847).

Das Ad2 DBP-Gen enthält 5 Sequenzen für HphI (236, 395, 696, 1331, 1529), SacIII (314, 965, 1262, 1766, 1786), TaqI (1016, 1623, 1629, 1697, 1890).

RsaI (7, 37, 173, 214, 1100, 1268), DdeI (349, 590, 754, 1021, 1331, 1709), EcoRII (31, 58, 79, 572, 643, 1185), ApyI (33, 60, 81, 574, 645, 1187) und HinfI (603, 1111, 1373, 1676, 1694, 1883) können die Sequenz 6mal schneiden.

Für HpaII sind 7 Erkennungssequenzen vorhanden (1, 522, 695, 797, 813, 883, 1476). AluI (68, 76, 372, 618, 1008, 1158, 1211, 1233), HaeII (89, 133, 522, 720, 1509, 1564, 1585, 435) und HgaI (34, 553, 808, 829, 1376, 1610, 1710, 1785) besitzen jeweils 8 Erkennungssequenzen.

9 Sequenzen für MboII (787, 875, 1363, 1408, 1504, 1510, 1666, 1669, 1822), 10 für HaeIII (460, 539, 812, 821, 877, 902, 1202, 1610, 1635, 1847) und 10 für MboI (558, 563, 735, 858, 894, 1017, 1250, 1320, 1539, 1875) komplettieren die Auflistung der Endonukleasen, deren Restriktionsfragmente für Sequenzierungszwecke noch nicht zu klein werden.

Häufiger als 10mal treten die Sequenzen für BbvI (13mal), MnlI (17mal) und Fnu4HI (24mal) auf.

Die Schnittstelle bei der Nukleotidposition 1610 scheint besonders exponiert zu sein: Dort schneiden 5 verschiedene Endonukleasen. Die Erkennungssequenz für HaeIII ist in denen von BalI und HaeI enthalten, aber auch HgaI, dessen Erkennungssequenz 5 bp vor seinem eigentlichen Schnitt aufhört, und MnlI, dessen Sequenz 15 bp sequenzaufwärts erst beginnt, schneiden an dieser Position.

Anhand der nunmehr bekannten genauen Schnittstellen von AluI, HaeIII und HpaII läßt sich die Genauigkeit der Restriktionsendonuklease-Kartierung des BglII J- und des EcoRI B/BglII C--Fragments mit diesen Endonukleasen festlegen. In Tabelle 10 werden die nach der Kartierung und Sequenzierung ermittelten Subfragmentgrößen einander gegenübergestellt.

Subfragmentbezeichnung	bp Kartierung	bp Sequenzierung	Differenz Δbp
BglII J/AluI-2	302	296	+6
BglII J/AluI-4	245	246	-1
BglII J/AluI-3	245	240	+5
BglII J/HpaII-1	530	521	+9
BglII J/HpaII-3	170	173	-3
BglII J/HpaII-4	97	102	-5
BglII J/HpaII-neu	-	16	-
BglII J/HpaII-6	52	45,(61)	+7,(-9)
EcoRI B/BglII C/HpaII-5	25	25	±0
EcoRI B/BglII C/HpaII-2	589	593	-4
EcoRI B/BglII C/HaeIII-12	21	19	+2
EcoRI B/BglII C/HaeIII-11	88	25	+63
EcoRI B/BglII C/HaeIII-4	235	300	-65
EcoRI B/BglII C/HaeIII-2	412	408	+4
EcoRI B/BglII C/HaeIII-neu	-	25	-
EcoRI B/BglII C/HaeIII-5	235	212,(237)	+23,(-2)
EcoRI B/BglII C/AluI-2	147	150	-3
EcoRI B/BglII C/AluI-3	133	150	-17
EcoRI B/BglII C/AluI-4	60	53	+7
EcoRI B/BglII C/AluI-5	25	22	+3

Tabelle 10: Vergleich der BglII J- und EcoRI B/BglII C-Subfragmentgrößen nach Kartierung und Sequenzierung
Erläuterung s. Text

Die Differenz der nach der Kartierung gefundenen Subfragmentgrößen zu den Werten aus der Sequenzierung ist angegeben.

Da ein kleines BglII J/HpaII-Fragment (16 bp) und ein weiteres kleines EcoRI B/BglII C/HaeIII-Fragment (25 bp) bei der Kartierung nicht aufgefunden und in die Karte mit einbezogen wurde, werden die Werte nach Sequenzierung einmal unter Ausschluß und einmal unter Einschluß dieser kleinen Subfragmente angegeben.

Die Differenz von -17 bp beim EcoRI B/BglII C/AluI-3-Fragment ist noch zu tolerieren. Gravierender ist die Fehlbestimmung im EcoRI B/BglII C/HaeIII-11- und HaeIII-4-Fragment. Da die $\pm$ Differenzen in diesen Subfragmenten annähernd gleich groß sind, besteht die Möglichkeit, daß ein Partialprodukt nicht detektiert oder das Partialprodukt einem falschen Subfragment nach Totalverdauung zugeordnet wurde. Eine Verbesserung der Differenz für EcoRI B/BglII C/HaeIII-4 ergibt sich, wenn eine nach einer Totalverdauung erhaltene Größe von 281 bp für dieses Fragment eingesetzt wird: Die Differenz zur wahren Größe beträgt dann nur noch -19 bp.

3. Der Leseraster für den Hauptkörper der Ad2 DBP mRNA

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Ad2 DBP mRNA das Transkriptionsprodukt vom l-Strang der Ad2 DNA in der frühen Region 2, und sie ist somit homolog zu der Nukleotidabfolge im r-Strang der frühen Region 2. Der Hauptkörper der Ad2 DBP mRNA, also der proteincodierende Teil, bildet im elektronenmikroskopischen Bild ein kolineares, kontinuierliches Hybrid mit DNA der Region 66,6 - 61,8 (Berk und Sharp, 1978; Kitchingman et al., 1977).

Auf DNA-Ebene mußte demzufolge die Verteilung des Proteininitiationscodons ATG und der Proteinterminationscodons TAA, TAG und TGA vorrangig auf dem r-Strang, aber auch auf dem l-Strang, der keinen offenen Leseraster von der für den Hauptkörper der Ad2 DBP mRNA notwendigen Codierungskapazität besitzen durfte, in allen drei möglichen Leserastern untersucht werden.

Es ergab sich folgende Anordnung dieser Translationssignale in der Sequenz, wobei jeweils die Position des 1. Nukleotids eines Signals angegeben wird:

1. Leseraster r-Strang 5'→ 3' (er korrespondiert zu der Triplettanordnung der Sequenz in Abb. 18):
TAA: 264, 231, 126, 24
TAG: 1863, 177
TGA: nicht gefunden
ATG: 1881, 1851

2. Leseraster r-Strang 5'→ 3' (er ist um 1 Nukleotid zum 3'--Ende hin versetzt und beginnt somit bei der Nukleotidposition 1928):
TAA: 1472, 1343, 1250, 1184, 1079, 980, 209
TAG: 515
TGA: 1880, 1544, 1430, 1346, 1334, 1280, 1157, 1130, 1124, 983, 965, 950, 923, 893, 680, 593, 563, 518, 410
ATG: 1667, 1514, 1427, 953, 872, 830, 641, 290

3. Leseraster r-Strang 5'→ 3' (er ist um 2 Nukleotide zum 3'--Ende hin versetzt und beginnt bei der Nukleotidposition 1927):
TAA: 1450, 1258, 1006, 976, 745, 709, 422, 346, 334, 235
TAG: 1909, 910, 295, 100, 73
TGA: 1888, 1426, 1369, 1357, 1225, 1024, 961, 829, 772, 388, 352, 271, 190, 148
ATG: 1198, 160, 19

1. Leseraster l-Strang 5'→ 3' (er ist um 2 Nukleotide zum 3'--Ende hin versetzt und beginnt bei der Nukleotidposition 3):
TAA: 162, 168, 192, 345, 744, 984, 1005, 1908
TAG: 333, 708, 909
TGA: 378, 444, 726, 735, 1149, 1236, 1467, 1488
ATG: 18, 159, 201, 1554, 1632

2. Leseraster l-Strang 5'→ 3' (erkorrespondiert zu der Triplettdarstellung der Sequenz in Abb. 18):
TAA: nicht gefunden
TAG: 421, 616, 670, 997, 1183, 1231, 1249, 1471, 1504, 1864
TGA: 151, 226, 652, 1672, 1783, 1921
ATG: 295, 640, 829

3. Leseraster l-Strang 5'→ 3' (er ist um 1 Nukleotid zum 3'--Ende hin verstezt und beginnt bei der Nukleotidposition 2):
TAA: 23, 263
TAG: 125, 176, 1073
TGA: 686, 755, 806
ATG: 170, 725, 782, 987, 1298, 1607, 1775, 1880

Die Verteilung der Translationssignale wird in einer diagrammatischen Darstellung übersichtlicher (Abb. 23), die deutlich zeigt, daß nur der Leseraster 1 des r-Strangs offen ist. Er erstreckt sich vom Proteininitiationscodon ATG bei der Position 1851 bis zum Terminationscodon TAA bei der Position 264 und umfaßt 1587 Nukleotide. Der Hauptkörper der Ad2 DBP mRNA kann also 529 Aminosäuren codieren. Es sei an die Schätzung in Abschnitt II erinnert, wonach der Hauptkörper der DBP mRNA 1578 Nukleotide mit einer Codierungskapazität für 526 Aminosäuren haben sollte.

Sequenzaufwärts befindet sich in einem Abstand von 30 Nukleotiden von dem Proteininitiationscodon ATG_{1851} ein weiteres

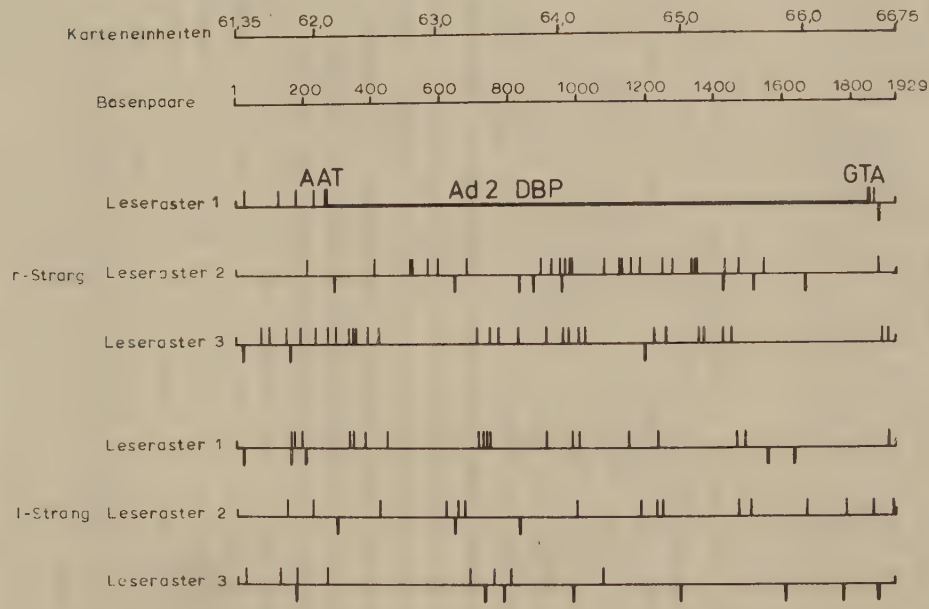


Abb. 23: Die Translationssignale im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP Gen

Legende:

1. Der offene Leseraster 1 im r-Strang, der die Codierung für das Ad2 DBP ermöglicht, ist dick ausgezogen und mit seinem Initiations- und Terminationscodon dargestellt.
2. Von den Leserastern nach oben weisende Strichmarken stellen die Terminationscodons TAA, TAG und TGA dar. Die dickeren nach unten weisenden Strichmarken stehen für das Initiationscodon ATG.
3. Weitere Erläuterungen werden im Text gegeben.

Signal ATG_{1881}. Diese Signalanordnung führt zu der Überlegung, ob das aminoterminale Ende des DBP von dem Signal ATG_{1881} als funktionellem Initiationscodon determiniert wird.

Zu diesem Problem hat Kozak (1981) eine vergleichende Studie über die das Proteininitiationscodon ATG flankierenden Nukleotide angestellt. Er fand, daß das funktionelle Proteininitiationscodon in den mRNAs für humanes γ-Globin, β--Globin des Huhns, β-Globin des Krallenfrosches Xenopus, humanes Präproinsulin, die Wachstumshormone des Menschen und der Ratte, die HCGHα-Untereinheit, die Proteine σ2, σ3, µNS und µ2 von Reoviren, das Onkogen von Moloney-Mäusesarkom-Virus, das Metallothionein-I der Maus und das Strukturprotein VP3 von SV40 durch das Auftreten von Guaninen 3 Nukleotide vor Beginn und 4 Nukleotide nach Beginn des AUGs gekennzeichnet sind. Die Guanine, bzw. Purine im allgemeinen, sollen das Erkennen des AUG-Codons während der Bildung des ribosomalen Initiationskomplexes erleichtern.

Für die Ad2 DBP mRNA findet sich diese Struktur -3GNNATGG+4 nur bei dem ATG_{1851}, das ATG_{1881} dagegen besitzt die Umgebungsstruktur -3TNNATGA+4. Hier kommt hinzu, daß sich ein Terminationscodon TAG bei der Position 1863 befindet. Würde die Synthese des Ad2 DBP beim ATG_{1881} initiiert werden, so müßte sie beim TAG_{1863} bereits wieder abgebrochen werden.

Als funktionelles Proteininitiationscodon ist demnach das ATG_{1851} anzusehen. Seine genomische Position fällt mit der BalI-Erkennungssequenz zusammen, die nach der Gesamtkartierung des Ad2 Genoms bei der Kartenposition 66,1 liegt. Ausgehend von der neu bestimmten HpaII-Schnittstelle bei der Kartenposition 61,35 liegt die BalI-Erkennungssequenz und das ATG_{1851} aber bei der Kartenposition 66,64 und das funktionelle Terminationscodon TAA_{264} ist auf die Kartenposition 62,10 festzulegen. Diese Werte weichen von den Daten nach elektronenmikroskopischer Heteroduplexanalyse nur um 0,04 Karteneinheiten für das Proteininitiationscodon und um 0,3 Karteneinheitenfür das Terminationscodon ab (Kitchingman et al., 1977).

Bei der Betrachtung des Leserasters 3 im l-Strang ist zu bemerken, daß 4 mögliche Proteininitiationscodons ATG auftreten, die einen Leseraster öffnen können, der, soweit wie in dieser Arbeit sequenziert worden ist, nicht durch Terminationscodons unterbrochen wird. Mit den flankierenden Nukleotiden besitzen diese ATG-Codons folgende Strukturen:

ATG_{1298}: TCCATGC
ATG_{1607}: GCAATGG
ATG_{1775}: TCCATGG
ATG_{1880}: ATCATGG

Eine mRNA, deren Hauptkörper mit einem dieser Initiationscodons beginnen kann, ist bekannt. Das 5'-Ende des Hauptkörpers der mRNA für das 100kD-Nichtstrukturprotein ist nach elektronenmikroskopischer Heteroduplexanalyse zwischen die Kartenpositionen 66,0 - 68,0 plaziert worden (Chow und Broker, 1978). Die 100kD mRNA wird vom r-Strang transkribiert und hat somit die gleiche Polarität wie der l-Strang. Darüber hinaus sind die 5'-Termini der DBP mRNA und der 100kD mRNA auf den komplementären Strängen sehr eng benachbart. Aufgrund ihrer Purinflankierungen in den Positionen -3 und +4 können die Codons ATG_{1607} oder ATG_{1880} das aminoterminale Ende des 100kD-Proteins determinieren.

Da zum 5'-Ende des r-Strangs hin noch 78 Nukleotide auf das Initiationscodon ATG_{1851} in der Sequenz folgen, bestand die Möglichkeit, in diesen 78 Nukleotiden nach einer Spleißregion zu suchen, die das 5'-Ende des Hauptkörpers der DBP mRNA mit dem 3'-Ende des Introns verbindet, dessen 5'-Ende wiederum mit dem 3'-Ende der 2. Führungssequenz von Ad2 DBP mRNA bei den Kartenpositionen 68,4 - 68,6 verbunden ist.

Vergleichende Untersuchungen von etlichen 5'- und 3'-Enden der Introns eukaryotischer prä-mRNA führten Breathnach at al. (1978) zu der Aufstellung der Regel, daß 5'-Enden von Introns durch das Dinukleotid GT und 3'-Enden von Introns durch das Dinukleotid AG charakterisiert sind.

Für Intron-5'-Enden wird diese Regel nach der Auffassung von Seif et al. (1979), die 35 5'-Introngrenzen in prä-mRNAs eukaryotischer Organismen miteinander verglichen, nur im

Falle einer Immunglobulin γ1-Kette durchbrochen. Für das Auftreten des AG-Dinukleotids am 3'-Intronende finden sie in 39 Fällen keine Ausnahme.

Sharp (1981) findet in 38 Fällen für das 5'-Intronende keine Ausnahme von der GT-Regel, dagegen eine Ausnahme von der AG--Regel im 3'-Intronende in der prä-mRNA für die Immunglobulin λIJ1-CI-Kette.

Lerner et al. (1980) gaben nach dem Vergleich von 37 3'-Intronenden für 31 Sequenzen folgende "Konsensussequenz" an: 3'-GACNYYYNY-5'. Y steht für Pyrimidine, N für frei zu besetzende Nukleotide. Auch Sharp (1981) kommt zu dieser Angabe der Konsensussequenz.

In den 78 Nukleotiden sequenzaufwärts von dem ATG_{1851} befinden sich im r-Strang 5 GA-Dinukleotide mit folgender Nukleotidumgebung, beginnend mit der Position des 1. Guanins:

1855 3'-GAAGAGGAT-5'
1858 3'-GAGGATATC-5'
1861 3'-GATATCCGT-5'
1907 3'-GATTGGCGG-5'
1918 3'-GAAACTCAA-5'

Obwohl keine dieser Sequenzen an 3. Position ein Cytosin enthält, stimmt nur die Sequenz 1861 3'-GATATCCGT-5' mit der Abfolge der Nukleotide in der Konsensussequenz überein. Ein Vergleich dieser Sequenz mit 8 3'-Intronenden von prä-mRNAs, die nach Sharp (1981) auf DNA-Ebene ebenfalls mit dem Triplett GAT beginnen (humanes β-Globin, β-Globin der Maus, T-Antigen von SV40, Intron zwischen 2. und 3. Führungssequenz von später Ad2 prä-mRNA, Immunglobulin µCH4-CM1, Immunglobulin γ1-CH1, Immunglobulin γ1-Hinge-CH2 und T-Antigen des BK-Virus), zeigt, daß die Sequenz 1861 3'-GATATCCGT-5' in 6 Nukleotiden mit dem 3'--Intronende der prä-mRNA des T-Antigens von BK-Virus am besten übereinstimmt:

1861 3'-GATATCCGT-5'
3'-GATATTTTT-5' ← Spleiß im T-Antigen des BK-Virus

Sharp (1981) zeigte außerdem, daß in 20 von 38 untersuchten 3'-Intronenden ein Guanin vor dem Beginn des Introns zu finden ist. Bei der Position 1860 befindet sich auch im Ad2 DBP-Gen

ein Guanin. Es besteht somit die hohe Wahrscheinlichkeit, daß das primäre Transkript der frühen Region 2 zwischen diesem und dem nächsten Guanin im Intron geschnitten und gespleißt wird.

Darüber hinaus stellt die Sequenz $_{1860}$GGATATCC$_{1867}$ im r-Strang ein Palindrom dar, das mit den flankierenden Nukleotiden folgende Struktur hat:

5'l-TCTCCTATAGGCAG-3'l

3'r-AGAGGATATCCGTC-5'r

So entsteht auch im l-Strang in 3'→ 5'-Richtung ein 3'-Intronende von der Struktur 1866-GATATCCTC, das ebenfalls, mit Ausnahme des Thymins an 3. Position, der Konsensussequenz entspricht. Es könnte sich hierbei um das Spleißsignal für das primäre Transkript der 100kD mRNA handeln, wenn das ATG$_{1880}$ im l-Strang als funktionelles Proteininitiationscodon dieser mRNA angesehen wird. Eine Klärung dieser Situation muß durch weitere Sequenzierung herbeigeführt werden.

4. Der Codongebrauch im Ad2 DBP-Gen, die Aminosäurenzusammensetzung des Ad2 DBP und sein entsprechendes Molekulargewicht

Vor der Aufstellung der hypothetischen Aminosäuresequenz des Ad2 DBP sollten durch Analyse der für das Ad2 DBP gebrauchten Codons Angaben über die Selektivität synonymer Codons gefunden werden, denn das Ad2 DBP-Gen reguliert auf diese Weise die Akkumulation und Konzentration der verschiedenen tRNA--Species an den DBP-synthetisierenden Polysomen.

In Tabelle 11 wird der Codongebrauch im Ad2 DBP-Gen aufgeschlüsselt. Bevor die Häufigkeit einzelner Codons betrachtet werden soll, erlaubt bereits die Verteilung der 4 Basen auf das 1., 2. oder 3. Codonnukleotid eine Beurteilung ihrer Frequenz im Ad2 DBP-Gen:

1. Codonnukleotid: A 133x (Lys, AsN, Thr, Arg, Ser, Ile, Met)
C 147x (GlN, His, Pro, Arg, Leu)
G 173x (Glu, Asp, Ala, Gly, Val)
T 76x (Tyr, Ser, Cys, Trp, Leu, Phe)

2. Codonnukleotid	1. Codonnukleotid: A		C		G		T	
A	A Lys 4	C AsN 19	A GlN 4	C His 13	A Glu 19	C Asp 15	A Stop 0	C Tyr 3
	G Lys 31	T AsN 4	G GlN 17	T His 3	G Glu 25	T Asp 9	G Stop 0	T Tyr 3
C	A Thr 1	C Thr 12	A Pro 11	C Pro 12	A Ala 5	C Ala 9	A Ser 2	C Ser 9
	G Thr 7	T Thr 2	G Pro 13	T Pro 6	G Ala 27	T Ala 6	G Ser 9	T Ser 5
G	A Arg 1	C Ser 15	A Arg 3	C Arg 16	A Gly 4	C Gly 10	A Stop 0	C Cys 11
	G Arg 3	T Ser 4	G Arg 12	T Arg 2	G Gly 6	T Gly 5	G Trp 6	T Cys 2
T	A Ile 4	C Ile 8	A Leu 9	C Leu 1	A Val 2	C Val 0	A Leu 0	C Phe 11
	G Met 15	T Ile 3	G Leu 23	T Leu 2	G Val 30	T Val 1	G Leu 7	T Phe 8

Tabelle 11: Aminosäurecodongebrauch im Ad2 DBP-Gen
Erläuterungen s. Text

2. Codonnukleotid: A 169x (Lys, AsN, GlN, His, Glu, Asp, Tyr)
C 136x (Thr, Pro, Ala, Ser)
G 100x (Arg, Ser, Gly, Lys, Trp)
T 124x (Met, Ile, Leu, Val, Phe)

3. Codonnukleotid: A 69x (Lys, GlN, Glu, Thr, Pro, Ala, Ser, Arg, Gly, Ile, Leu, Val)

C 164x (AsN, His, Asp, Tyr, Thr, Pro, Ala, Ser, Arg, Gly, Cys, Ile, Leu, Val, Phe)

G 231x (Lys, GlN, Glu, Thr, Pro, Ala, Ser, Arg, Gly, Trp, Met, Leu, Val)

T 65x (AsN, His, Asp, Tyr, Thr, Pro, Ala, Ser, Arg, Gly, Cys, Ile, Leu, Val, Phe)

Bei der Besetzung des 1. Codonnukleotids ist nur Thymin unterrepräsentiert, eine Folge der relativ geringen Häufigkeit von Tyrosin, Cystein, Tryptophan und Phenylalanin im Ad2 DBP. Im 2. Codonnukleotid treten die 4 Basen annähernd gleich häufig auf ($\bar{X} = 132 \mp 28$). Hier ist der genetische Code am geringsten degeneriert: Nur die Codons für Serin enthalten entweder ein Cytosin oder ein Guanin an 2. Position.

Erst bei der Wahl des 3. Codonnukleotids diskriminiert das Ad2 DBP-Gen sehr stark: Obwohl mit der Ausnahme von Isoleucin, Tryptophan und Methionin 11 für die gleichen Aminosäuren determinierende Codons sowohl ein Adenin als auch ein Guanin als 3. Codonnukleotid enthalten können, tritt Guanin 162mal häufiger an dieser Position auf als Adenin. Schließlich tritt Cytosin als 3. Codonnukleotid 99mal häufiger als Thymin auf, aber die Codons für 15 gleiche Aminosäuren können mit einem Cytosin oder Thymin an 3. Codonposition besetzt werden.

Es ist wiederum die Häufigkeit des CpG-Dinukleotids, die bei der Betrachtung einzelner Aminosäurecodons auffällt. Von den 4 Codons für Arginin, die mit einem CG beginnen, treten jene, die ein Adenin oder Thymin als 3. Codonnukleotid besitzen, nur 3- bzw. 2mal auf. Jene aber, die ein Guanin oder Cytosin als 3. Codonnukleotid haben, kommen 16- bzw. 12mal vor. Die Codons CCG für Prolin und GCG für Alanin finden die häufigste Verwendung für diese Aminosäuren. Insgesamt befinden sich 89 Codons mit einem CG-Dinukleotid unter den 529 Codons für das Ad2 DBP, das sind 16,82%.

Unabhängig davon werden einige Codons extrem häufig benutzt: AAG codiert 31mal für Lysin, AAA nur 4mal. GCA, GCC und GCT für Alanin treten zusammen 20mal auf, GCG für Alanin allein

aber 27mal. Während die Codons GTC für Valin und TTA für Leucin überhaupt nicht benutzt werden, treten GTG für Valin 30mal unter den 33 Valincodons und CTG für Leucin 23mal unter den 42 Leucincodons auf.

Noch ist die physiologische Bedeutung der Bevorzugung einzelner Codons unzureichend bekannt.

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäurenzusammensetzung des Ad2 DBP wird in Tabelle 12 der nach physikochemischer Bestimmung von gereinigtem Ad2 DBP erhaltenen Aminosäurenzusammensetzung (Linné et al., 1977) gegenübergestellt. Mit der Ausnahme von Glycin, für das der "Sequenzwert" vom physikochemischen Wert um -7,3 Mol% abweicht, ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit einer mittleren Abweichung von ∓0,25 Mol%.

Die Tabelle 12 schlüsselt die Aminosäuren des Ad2 DBP auf in solche mit unpolaren, ungeladenen polaren und geladenen polaren (sauren und basischen) Seitenketten. Dabei fallen die Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten, die hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können, erwartungsgemäß am häufigsten an.

Das hypothetische Ad2 DBP ist bei pH=7,0 ein positiv geladenes Protein: Es sind 20 basische Aminosäuren mehr als saure Aminosäuren vorhanden. Die Basizität des Ad2 DBP geht aber nicht so weit wie bei den Histonen, in denen Lysin und Arginin zu 9 - 27 Mol% vertreten sind (Isenberg, 1979).

Einen vorläufigen Eindruck von der Struktur des Ad2 DBP erhält man, wenn die Aminosäuren des DBP nach ihrer Fähigkeit angeordnet werden, stabile α-helikale Bereiche auszubilden, α-helikale Bereiche zu destabilisieren und α-helikale Bereiche abzubrechen bzw. die Bildung α-helikaler Bereiche zu unterbinden. Zu den α-helixstabilisierenden Aminosäuren gehören Alanin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein, Methionin, Histidin, Asparagin, Glutamin und Valin, von denen das Ad2 DBP 241 Reste enthält.

Serin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin, Arginin und Glycin destabilisieren α-helikale Bereiche, sie treten 246mal im Ad2 DBP auf.

Prolin, das eine Iminogruppe (NH-) anstelle einer Aminogruppe (NH_2) im Molekül hat, ist dadurch, daß das Wasserstoffatom

Aminosäure	Anzahl	Mol%	Mol% nach Linné et al.
Ala	47	8,9	7,8
Val	33	6,2	4,7
Leu	42	7,9	7,7
Ile	15	2,8	3,0
Pro	42	7,9	7,0
Phe	19	3,6	3,7
Trp	6	1,1	nicht bestimmt
Met	15	2,8	1,4
unpolar	219	41,2	
Gly	25	4,7	12,0
Ser	44	8,3	8,5
Thr	22	4,2	4,4
Cys	13	2,6	nicht bestimmt
Tyr	6	1,1	2,5
AsN	23	4,4	9,0
GlN	21	4,0	12,0
polar	154	29,3	
Asp	24	4,6	
Glu	44	8,3	
sauer	68	12,9	
Lys	35	6,6	6,3
Arg	37	7,0	7,2
His	16	3,0	2,8
basisch	88	16,6	16,3

Tabelle 12: Aminosäurenzusammensetzung des Ad2 DBP

Legende:

1. AsN und Asp, bzw. GlN und Glu wurden nach Hydrolyse von Linné et al. gemeinsam bestimmt.
2. Da Trp und Cys von Linné et al. nicht bestimmt wurden, entfällt die Summation für die unpolaren, polaren und sauren Aminosäuren.

dieser Iminogruppe bei der Peptidbindung verloren geht, nicht in der Lage, mit seiner Nachbaraminosäure eine Peptidbindung zu bilden, die als Wasserstoffdonator mit dem wasserstoffakzeptierenden Aminosäurerest in der Helixwindung darüber eine Brückenbildung eingeht. Die Ausbildung einer α-Helix unterbleibt, bzw. wird abgebrochen, wenn ein Prolin in der Aminosäuresequenz auftritt.

Ad2 DBP besitzt 42 Proline, zusammen mit den 246 helixdestabilisierenden Aminosäuren werden sicherlich große Bereiche im Ad2 DBP vorhanden sein, die nicht α-helikal angeordnet sind. Im Abschnitt 5. wird näher auf die Prolinverteilung im Ad2 DBP eingegangen.

Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Ad2 DBP hat ein Molekulargewicht von 59069 Daltons. Das hier gefundene Molekulargewicht des unphosphorylierten DBP differiert von dem in der SDS-PAGE bestimmten Molekulargewicht um mehr als 10000 Daltons, bzw. beträgt nur 84% des Werts aus der SDS-PAGE-Bestimmung.

Segrest und Jackson (1972) haben eine Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit von glykosylierten Proteinen in der SDS--PAGE festgestellt.

Das 362 Aminosäuren enthaltende Strukturprotein VP1 von SV40 besitzt 28 Proline, entsprechend 7,7 Mol%, also eine mit Ad2 DBP vergleichbare Prolinhäufigkeit (Kempe et al., 1979). Auch für VP1 von SV40 mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40168 Daltons (Fiers et al., 1978) besteht zu einem mittleren Wert nach SDS-PAGE-Bestimmung eine Diskrepanz von -5300 Daltons, hier beträgt also der aus der DNA-Sequenz abgeleitete Wert 88% desjenigen nach SDS-PAGE-Bestimmung.

5. Die hypothetische Aminosäuresequenz des Ad2 DBP

Die Sequenz der 529 Aminosäuren des Ad2 DBP - das aminoterminale Initiationsmethionin wird wahrscheinlich im posttranslationellen Processing eliminiert - wird in Abb. 24 wiedergegeben.

Die in Abschnitt III.4. getroffene Aussage, daß es kaum α-helikale Sekundärstrukturen im Ad2 DBP geben wird, kann durch

```
1                                                  10
Met-Ala-Ser-Arg-Glu-Glu-Glu-GlN-Arg-Glu-Thr-Thr-Pro-Glu-Arg-
                  20                                       30
Gly-Arg-Gly-Ala-Ala-Arg-Arg-Pro-Pro-Thr-Met-Glu-Asp-Val-Ser-
31                                                 40
Ser-Pro-Ser-Pro-Ser-Pro-Pro-Pro-Pro-Arg-Ala-Pro-Pro-Lys-Lys-
                  50                                       60
Arg-Leu-Arg-Arg-Arg-Leu-Glu-Ser-Glu-Asp-Glu-Glu-Asp-Ser-Ser-
61                                                 70
GlN-Asp-Ala-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Pro-Ser-Pro-Arg-Pro-Ser-Thr-
                  80                                       90
Ser-Thr-Ala-Asp-Leu-Ala-Ile-Ala-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-
91                                                 100
Pro-Ser-Pro-Lys-Pro-Glu-Arg-Pro-Pro-Ser-Pro-Glu-Val-Ile-Val-
                  110                              ↓       120
Asp-Ser-Glu-Glu-Glu-Arg-Glu-Asp-Val-Ala-Leu-GlN-Met-Val-Gly-
121                                                130
Phe-Ser-AsN-Pro-Pro-Val-Leu-Ile-Lys-His-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-
                  140                                      150
Arg-Thr-Val-Arg-Arg-Leu-AsN-Glu-Asp-Asp-Pro-Val-Ala-Arg-Gly-
151                                                160
Met-Arg-Thr-GlN-Glu-Glu-Lys-Glu-Glu-Ser-Ser-Glu-Ala-Glu-Ser-
                  170                                      180
Glu-Ser-Thr-Val-Ile-AsN-Pro-Leu-Ser-Leu-Pro-Ile-Val-Ser-Ala-
181                                                190
Trp-Glu-Lys-Gly-Met-Glu-Ala-Ala-Arg-Ala-Leu-Met-Asp-Lys-Tyr-
                  200                                      210
His-Val-Asp-AsN-Asp-Leu-Lys-Ala-AsN-Phe-Lys-Leu-Leu-Pro-Asp-
211                                                220
GlN-Val-Glu-Ala-Leu-Ala-Ala-Val-Cys-Lys-Thr-Trp-Leu-AsN-Glu-
                  230                                      240
Glu-His-Arg-Gly-Leu-GlN-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-AsN-Lys-Thr-Phe-
```

Abb.24: Die hypothetische Aminosäuresequenz des Ad2 DBP

Legende:

1. Die Sequenz beginnt mit dem Initiationsmethionin am aminoterminalen Ende.
2. Helixdestabilisierende Aminosäuren sind punktiert gekennzeichnet.
3. Proline sind unterstrichen.
4. Prolinflankierte Sequenzabschnitte sind ebenfalls unterstrichen.
5. Das Methionin in der aminoterminalen Domäne (25kD--Chymotrypsin-Spaltprodukt) an der Position 26 ist doppelt unterstrichen.
6. Die mögliche Chymotrypsin-Spaltstelle nach dem Leucin bei Position 116 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

```
241                                                 250
Val-Thr-Met-Met-Gly-Arg-Phe-Leu-Gln-Ala-Tyr-Leu-Gln-Ser-Phe-
                260                                 270
Ala-Glu-Val-Thr-Tyr-Lys-His-His-Glu-Pro-Thr-Gly-Cys-Ala-Leu-
271                                                 280
Trp-Leu-His-Arg-Cys-Ala-Glu-Ile-Glu-Gly-Glu-Leu-Lys-Cys-Leu-
                290                                 300
His-Gly-Ser-Ile-Met-Ile-Asn-Lys-Glu-His-Val-Ile-Glu-Met-Asp-
301                                                 310
Val-Thr-Ser-Glu-Asn-Gly-Gln-Arg-Ala-Leu-Lys-Glu-Gln-Ser-Ser-
                320                                 330
Lys-Ala-Lys-Ile-Val-Lys-Asn-Arg-Trp-Gly-Arg-Asn-Val-Val-Gln-
331                                                 340
Ile-Ser-Asn-Thr-Asp-Ala-Arg-Cys-Cys-Val-His-Asp-Ala-Ala-Cys-
                350                                 360
Pro-Ala-Asn-Gln-Phe-Ser-Gly-Lys-Ser-Cys-Gly-Met-Phe-Phe-Ser-
361                                                 370
Glu-Gly-Ala-Lys-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Lys-Gln-Ile-Lys-Ala-Phe-
                380                                 390
Met-Gln-Ala-Leu-Tyr-Pro-Asn-Ala-Gln-Thr-Gly-His-Gly-His-Leu-
391                                                 400
Leu-Met-Pro-Leu-Arg-Cys-Glu-Cys-Asn-Ser-Lys-Pro-Gly-His-Ala-
                410                                 420
Pro-Phe-Leu-Gly-Arg-Gln-Leu-Pro-Lys-Leu-Thr-Pro-Phe-Ala-Leu-
421                                                 430
Ser-Asn-Ala-Glu-Asp-Leu-Asp-Ala-Asp-Leu-Ile-Ser-Asp-Lys-Ser-
                440                                 450
Val-Leu-Ala-Ser-Val-His-His-Pro-Ala-Leu-Ile-Val-Phe-Gln-Cys-
451                                                 460
Cys-Asn-Pro-Val-Tyr-Arg-Asn-Ser-Arg-Ala-Gln-Gly-Gly-Gly-Pro-
                470                                 480
Asn-Cys-Asp-Phe-Lys-Ile-Ser-Ala-Pro-Asp-Leu-Leu-Asn-Ala-Leu-
481                                                 490
Val-Met-Val-Arg-Ser-Leu-Trp-Ser-Glu-Asn-Phe-Thr-Glu-Leu-Pro-
                500                                 510
Arg-Met-Val-Val-Pro-Glu-Phe-Lys-Trp-Ser-Thr-Lys-His-Gln-Tyr-
511                                                 520
Arg-Asn-Val-Ser-Leu-Pro-Val-Ala-His-Ser-Asp-Ala-Arg-Gln-Asn-
                529
Pro-Phe-Asp-Phe
```

Abb. 24, Fortsetzung

Analyse der Aminosäuresequenz überzeugend belegt werden. In Abb. 24 sind alle α-helixdestabilisierenden Aminosäuren durch Punktierung gekennzeichnet und Proline sind unterstrichen. Da sich in einer 360°-Windung der α-Helix 3,6 Aminosäuren befinden können, sind außerdem alle Aminosäuresequenzen unterstrichen, in denen 3 oder weniger als 3 Aminosäuren von Prolinen flankiert werden. Hier wird sich mit Sicherheit keine α-helikale Anordnung ausbilden können. Diese prolinflankierten Sequenzabschnitte häufen sich am aminoterminalen Ende.

Die weiteren Proline verteilen sich im Ad2 DBP so, daß sie zusammen mit den helixdestabilisierenden Aminosäuren die Bildung größerer zusammenhängender Sequenzen von α-helixbildenden Aminosäuren behindern. Die größte zusammenhängende helixbildende Region zwischen den Proteinen 476 bis 483 umfaßt nur 8 Aminosäuren.

Die von Schechter et al. (1980) für das Ad2 DBP beschriebene und zu Oligomeren führende Selbstassoziation in Lösungen geringer Ionenstärke in vitro findet durch diese Analyse der Aminosäuresequenz eine Bestätigung, denn das Ad2 DBP wird mit größerer Wahrscheinlichkeit in einer β-Konfiguration mit Faltblattstruktur als in einer globulären Struktur vorliegen. Auch die kooperative Bindung von Ad2 DBP an Einzelstrang-DNA, d.h. die Erscheinung, daß die Bindung weiterer DBP-Moleküle an Einzelstrang-DNA in der Replikationsgabel durch bereits dort gebundene DBP-Moleküle gefördert wird, kann durch die dabei wachsende Stabilisierung der Faltblattstruktur erklärt werden.

Linné und Philipson (1980) erhielten nach kontrollierter Verdauung von gereinigtem Ad2 DBP mit Chymotrypsin zwei Spaltprodukte von 25 und 45kD nach Bestimmung in der SDS-PAGE. Das 25kD-Polypeptid vom aminoterminalen Ende zeigte keine Bindung an Einzelstrang-DNA und enthielt alle Phosphatgruppen im phosphorylierten Zustand des Ad2 DBP. Darüber hinaus fanden Linné et al. (1977) nach in vivo-Phosphorylierung des Ad2 DBP mit $[^{32}P]$-Orthophosphat nur ein tryptisches Peptid, das ^{32}P inkorporiert hatte.

Die Fingerprintanalyse von [^{35}S]-methioninmarkiertem Ad2 DBP zeigte 13 tryptische methioninhaltige Peptide, die Fingerprints des 25kD-Chymotrypsin-Spaltprodukts dagegen wiesen nur ein [^{35}S]-markiertes tryptisches Peptid auf. Es sollte also möglich sein, in der hypothetischen Aminosäuresequenz des DBP die Chymotrypsin-Spaltstelle zu bestimmen und mögliche Phosphorylierungsstellen - Serine und Threonine - zu finden.

Chymotrypsin spaltet, wenn man Polypeptide vom Aminoende her betrachtet, nach Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin oder Leucin. Das erste Methionin nach dem Initiationsmethionin befindet sich bei der Position 26. Davor befindet sich keine für Chymotrypsin spezifische Spaltstelle. Das erste Phenylalanin tritt bei der Position 31 auf. Die letztmögliche Chymotrypsin-Spaltstelle liegt beim Leucin an Position 116, denn 2 Aminosäuren weiter ist bereits der nächste Methioninrest vorhanden.

Die Polypeptidkette bis zum Rest 116 hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 12813 Daltons, das liegt weit unter dem 25kD-Wert aus der SDS-PAGE. Allerdings besitzt dieser Abschnitt 21 Proline, entsprechend 18,10%. In Relation zu dem mit 84% des SDS-PAGE-Werts kalkulierten Molekulargewicht des gesamten Ad2 DBP nach Sequenzanalyse bei einer Prolinhäufigkeit von 7,9% wäre diesem Chymotrypsin-Spaltprodukt ein um 34,8% geringerer Wert, also von 65,2% des 25kD-Werts nach SDS-PAGE, zuzuordnen. Er beträgt 16300 Daltons.

Die hohe Prolinhäufigkeit in kleineren Polypeptiden scheint aber die Migrationsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE noch stärker zu verringern, so daß ein noch höheres Molekulargewicht vorgetäuscht wird.

Sind nun die singulären tryptischen Peptide nach [^{35}S]-Methionin- und [^{32}P]-Orthophosphatmarkierung identisch, so müssen beim Aufsuchen der trypsinspezifischen Spaltstellen amino- und carboxyterminal vom Methionin bei der Position 26 in der Peptidsequenz auch Serin- oder Threoninreste gefunden werden.

Folgende trypsinspezifische Spaltstellen liegen dem Methionin bei der Position 26 am nächsten: Aminoterminal hinter dem Arginin bei Position 22 und carboxyterminal hinter dem Arginin bei der Position 40. Dieser Sequenzabschnitt besitzt 4 Serine

und einen Threoninrest. Selbst wenn Trypsin auf Grund der Ladungsverhältnisse in dieser Region erst hinter dem zweit- oder drittnächsten Arginin oder Lysin amino- und carboxyterminal spaltet, treten keine neuen Serine oder Threonine dazu.

Wenn das einzelne tryptische Peptid nach $[^{32}P]$-Orthophosphatmarkierung nicht mit dem $[^{35}S]$-methioninmarkierten tryptischen Peptid identisch ist, dann tritt zwischen den Positionen 73 bis 90 ein weiteres mögliches Peptid auf, in dem Serin und Threonin zweimal unmittelbar aufeinander folgen (Pos. 74 -77) und noch ein weiteres Serin (Pos. 84) vorhanden ist.

Die genaue Position der Phosphorylierungsstellen in der aminoterminalen Domäne des Ad2 DBP kann nur mit proteinchemischen Sequenzierungsmethoden festgelegt werden.

An den Positionen 243 und 244 kommen 2 Methionine hintereinander vor, die dann nur in einem tryptischen Peptid liegen. Nach der posttranslationellen Abspaltung des aminoterminalen Methionins sind also tatsächlich nur 13 $[^{35}S]$-methioninmarkierte tryptische Peptide bei der Fingerprintanalyse des Ad2 DBP nachzuweisen (Linné et al., 1977).

Durch die Aufstellung der hypothetischen Aminosäuresequenz des Ad2 DBP wird man in die Lage versetzt, die Hydrophobizität des gesamten Moleküls als eine wichtige Eigenschaft von Proteinen zu berechnen.

Die Hydrophobizität einer Aminosäure oder einer Aminosäureseitenkette wird abgeleitet aus Messungen der Löslichkeit der Aminosäure in Wasser und in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Dioxan). Die Daten werden dann umgerechnet in die Molare Freie Energie für den Transfer (ΔF_t) der Aminosäure von einer wässerigen Lösung in eine Lösung mit organischen Lösungsmitteln bei der gleichen Molfraktion (N) an der Grenze einer unendlichen Verdünnung (γ):

$$\Delta F_t = RT \ln \frac{N_w \gamma_w}{N_{org} \gamma_{org}}$$

Die Hydrophobizität der Seitenkette, $H\bar{\Phi}$, wird dann berechnet durch Subtraktion von ΔF_t für Glycin. $H\bar{\Phi}$ hat die Dimension [cal/mol]. (Tanford, 1962; Nozaki und Tanford, 1971).

Die Hydrophobizitäten $H\bar{\Phi}$ der einzelnen Aminosäuren werden in Tabelle 13 wiedergegeben:

Aminosäure	$H\bar{\Phi}$ [cal/Mol]
Trp	3400
Ile	2950
Pro	2600
Phe	2500
Tyr	2300
Leu	1800
Val	1500
Lys	1500
Met	1300
Cys/2	1000
Arg	750
His	500
Ala	500
Thr	400
Gly	(0)
AsN	0
Asp	0
GlN	0
Glu	0
Ser	-300

Tabelle 13: Hydrophobizitäten von Aminosäuren

Die mittlere Hydrophobizität $H\bar{\Phi}_{ave}$ eines Proteins berechnet sich dann nach:

$$H\bar{\Phi}_{ave} = \frac{\sum_i n_i H\bar{\Phi}_i}{\sum_i n_i}$$

n_i = die Anzahl der Seitenketten der i-ten Aminosäure
$H\bar{\Phi}$ = ihre Hydrophobizität aus Tabelle 13

Um die Verteilung der Hydrophobizitäten im Ad2 DBP-Molekül zu erfassen, wurde die Aminosäuresequenz des DBP in 5 Bereiche aufgeteilt und $H\bar{\Phi}_{ave}$ getrennt berechnet. Es ergaben sich folgende Werte:

Position 1 - 116 : $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 913 cal/Mol
Position 117 - 200 : $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 849 cal/Mol
Position 201 - 300 : $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 1006 cal/Mol
Position 301 - 400 : $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 818 cal/Mol
Position 401 - 529 : $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 1053 cal/Mol

Die Hydrophobizität des gesamten Ad2 DBP-Moleküls beträgt 937 cal/Mol. Nach einer zusammenfassenden Übersicht von Bigelow und Channon (1976) besitzen sehr viele Proteine, sowohl globulärer als auch faseriger Struktur, Hydrophobizitäten von 930 - 940 cal/Mol. Das Ad2 DBP fällt hierbei also nicht heraus.

In zwei Bereichen (Pos. 201 - 300 und 401 - 529) liegt die Hydrophobizität aber über 1000 cal/Mol. Dementsprechend gibt es bei den Positionen 476 - 487 z.B. einen außerordentlich hydrophoben Bereich mit $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 1320 cal/Mol. Zum Vergleich besitzt das Reserveprotein des Weizenkorns, Gliadin, mit $H\bar{\Phi}_{ave}$ = 1300 cal/Mol einen der höchsten Werte für Gesamtproteine (Booth und Ewart, 1969). Das andere Extrem liegt z.B. in dem Bereich zwischen Aminosäurerest 52 - 62. Hier beträgt die Hydrophobizität $H\bar{\Phi}_{ave}$ = -82 cal/Mol.

Ob dem Wechsel von mehr oder weniger hydrophoben Domänen im Ad2 DBP eine Funktion bei der Bindung an Einzelstrang-DNA zukommt, wird künftig durch Mutantenanalysen zu entscheiden sein.

E. DISKUSSION

Die Bestimmung der Primärstruktur des Gens für das DNA-Bindungsprotein von Adenovirus Typ 2 sollte ein Schritt in dem Bemühen sein, die Struktur eines adenoviralen Gens besser zu verstehen und aus der davon abgeleiteten hypothetischen Aminosäuresequenz des Ad2 DBP vorläufige Aussagen über die Struktur des DBPs zu machen.

An die in dieser Arbeit vorgestellten Daten knüpfen sich einige Fragestellungen an, mit denen man sich beschäftigen muß, wenn man klären will, ob die gerade genannten Zielvorstellungen erreicht worden sind:

1. In welchem Maße gibt die in dieser Arbeit aufgestellte Nukleotidsequenz des proteincodierenden Teils im Ad2 DBP-Gen die tatsächliche molekulare Organisation dieses Gens wieder?
2. Welche Stellung nimmt das Ad2 DBP in der Proteinklasse der bekannten DNA-Bindungsproteine oder besser helixdestabilisierenden Proteine (HD-Proteine) ein?
3. Welche weiteren Schritte müssen nach der Bestimmung der Primärstruktur des Ad2 DBP-Gens unternommen werden, um genauere Vorstellungen über die Funktion des Ad2 DBPs zu bekommen?

Über die für die 3'-terminale Region der Ad2 DBP mRNA codierende DNA-Sequenz liegen bereits Daten in der Literatur vor.

Akusjärvi et al. (1981), die die für die 3'-nichtproteincodierende Region der Ad2 Hexon mRNA homologe DNA-Sequenz sequenzierten und das Gen für das neue 23kD-Protein von Ad2 identifizierten, haben dabei ebenfalls die DNA-Sequenz von der HpaII-Schnittstelle bei der Kartenposition 61,35 bis zur BalI-Schnittstelle bei der Kartenposition 62,9 mit der Methode von Maxam und Gilbert sequenziert. Mit diesen 542 Nukleotidpaaren beginnt auch die in dieser Arbeit aufgestellte Nukleotidsequenz. Beide Sequenzen stimmen in allen Nukleotiden überein.

Nach der Beendigung der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzierungsarbeiten im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens publizierten Kruijer et al. (1981) über die Struktur und Orga-

nisation des Gens für das DBP von Adenovirus Typ 5. Daraus geht hervor, daß der einzige offene Leseraster im r-Strang des Ad5 DBP-Gens ebenfalls 1587 Nukleotide enthält. Er beginnt mit den gleichen Proteininitiations- und Proteinterminationscodons an gleichen Positionen wie im Ad2 DBP-Gen.

Das Ad 5 DBP-Gen unterscheidet sich in der Verwendung von 39 Nuklectiden vom Ad2 DBP-Gen, die intertypische DNA-Homologie betrüge somit 97,98%. 11 Nukleotidänderungen im Ad5 DBP-Gen führen zu einer solchen Veränderung von Aminosäurecodons, daß 10 andere Aminosäuren im Ad5 DBP-Gen codiert werden müßten. Vom aminoterminalen Ende des DBPs aus betrachtet müßten folgende Aminosäureänderungen vom Ad2 DBP zum Ad5 DBP auftreten:

Position 47: Leu → Met
Position 51: Leu → Ile
Position 77: Thr → Ala
Position 84: Ser → Pro
Position 157: Lys → Glu
Position 160: Ser → Pro
Position 167: Ser → Ile
Position 170: Ile → Met
Position 175: Leu → Val
Position 237: AsN → Lys

Für das jeweils 1. Codonnukleotid bestehen 9 Austausche, von denen 7 zur Codierung von 7 anderen Aminosäuren im Ad5 DBP führen. Das 2. Codonnukleotid ist nur einmal geändert (Nukleotidposition 1352: G → T) und führt zusammen mit dem Wechsel im 3. Nukleotid des gleichen Codons (Nukleotidposition 1351: C → T) zur Aminosäureänderung Ser → Ile. Von den 29 Austauschen im 3. Codonnukleotid bewirken nur 3 die Codierung für eine andere Aminosäure im Ad5 DBP. Alle anderen Nukleotidänderungen bleiben auf der Translationsebene "stumm".

Die genetische Variabilität in den DBP-Genen sehr eng verwandter Adenovirus-Serotypen der Gruppe C darf demnach für das 3. Codonnukleotid relativ hoch sein, da sie selten zur Veränderung der Primärstruktur der Ad DBPs führt.

Die Aminosäureänderungen liegen vorwiegend im aminoterminalen Bereich des DBP, ein Indiz dafür, daß die intertypische Variabilität in dieser nicht Einzelstrang-DNA-bindenden Domäne grös-

ser sein darf als in der Einzelstrang-DNA-bindenden Domäne am carboxyterminalen Ende. Es wäre aus diesem Grunde wünschenswert, daß die Gene für die DBPs von Adenovirus Typ 1 und 6, die auch zur Untergruppe C gehören, sequenziert würden, um zu schauen, ob auch in diesen DBP-Genen die Codons in der carboxyterminalen Domäne genetisch invariant sind.

In der nichtproteincodierenden DNA-Region am 3'-Ende des Ad5 DBP-Gens fehlen 2 Nukleotidpaare, die in der hier vorgestellten DNA-Sequenz und auch in der oben beschriebenen Sequenz von Akusjärvi et al. (1981) im Ad2 DBP-Gen vorhanden sind (Pos. 179 und 241 in dieser Arbeit). Entweder ist die Ad5-Sequenz dort tatsächlich um 2 Nukleotidpaare kürzer oder es handelt sich um eine Fehlbestimmung.

Die Existenz des offenen Leserasters von 1587 Nukleotidpaaren im r-Strang des Ad2 DBP-Gens selbst ist ein Anhaltspunkt dafür, daß bei der Sequenzbestimmung nicht ein oder zwei Nukleotide ausgelassen oder hinzugefügt worden sind, denn die Auslassung oder Hinzufügung von Nukleotiden hätte einen Leserasterwechsel verursacht: Die Sequenz wäre im Leseraster 2 oder 3 des r--Strangs weiterzulesen gewesen, und Proteinterminationscodons wären in großer Zahl aufgetreten. Auch die gute Übereinstimmung der Sequenzwerte mit der physikochemischen Analyse des Ad2 DBPs (Linné et al., 1977) zeigt, daß im richtigen Leseraster eingefädelt worden ist.

Für den um 7,3 Mol% zu hohen Glycinwert nach physikochemischer Analyse des Ad2 DBP gibt es eine Erklärung, wenn die von Linné et al. (1977) angewandte Analysenmethode betrachtet wird: Nach SDS-PAGE wurden die 72kD-DBP enthaltenden Gelscheibchen in 0,1% SDS, 6M HCl und 0,5% 2-Mercaptoäthanol bei 110°C 24h hydrolysiert. Die Aminosäuren des Hydrolysats wurden anschließend in einem Aminosäure-Analyzer bei höchster Empfindlichkeit bestimmt.

Bei der Hydrolyse von leerem Polyacrylamid mit HCl entstehen Glycin und glycinartige Verbindungen, die zu einem zu hohen Gesamtglycinwert führen, wenn keine Korrekturen für die Hydrolyse des Polyacrylamids einbezogen werden (Houston, 1971). Linné et al. (1977) haben ihre Glycinwerte nicht in diesem Sinne korrigiert.

Bei einer durch fehlerhafte Sequenzbestimmung entstandenen Addition (Insertion) oder Verlust (Deletion) von 3 Nukleotiden hintereinander wäre die Aminosäuresequenz um eine Aminosäure verlängert oder verkürzt worden, der Leseraster aber wäre der gleiche geblieben. Bei der Zuordnung der Nukleotidsequenzen in den jeweils komplementären Strängen ist aber in keinem Fall ein ungepaartes Nukleotid aufgetreten, und an Positionen, an denen zunächst eine fehlerhafte Basenpaarung vorzuliegen schien, konnten durch wiederholte doppelsträngige Sequenzierung dieser Region, teilweise unter Verwendung anderer Subfragmente und asymmetrischer Spaltungen, alle Basen exakt einander zugeordnet werden.

Prinzipiell existieren 2 Methoden, um eine definierte Region doppelsträngiger DNA mittels der limitierten chemischen Degradation nach Maxam und Gilbert zu sequenzieren.

Die erste, die in dieser Arbeit angewendet worden ist, beruht auf der Aufstellung einer hinreichend genauen Restriktionsfragmentkarte der zu sequenzierenden DNA-Region. Aus der Restriktionskarte werden die Fragmente herausgesucht, die gut zu isolieren sind, d.h. die mit anderen Fragmenten keine Doppelbande im präparativen Gel bilden, und die unter Anwendung möglichst weniger Endonuklease-Verdauungen wiedergewonnen werden können.

Nach der 5'-Endmarkierung mit $[\gamma^{32}P]$-ATP und T4 Polynukleotidkinase werden sie mit einer weiteren Endonuklease, deren Schnittstelle ebenfalls aus der Karte hervorgeht, asymmetrisch geschnitten und die singulär 5'-endmarkierten Produkte frei von Kontaminanten isoliert. Für die Sequenzierung ist keine Strangtrennung erforderlich, und die Teilsequenzen können sofort dem 5'l- oder 5'r-Strang zugeordnet werden.

Mit fortschreitender Sequenzierung werden Erkennungssequenzen weiterer Endonukleasen in den Teilsequenzen gefunden, die für die Sequenzierung komplementärer Stränge herangezogen werden können. Durch geeignete Wahl von Fragmenten, die sich an den 5'- oder 3'-Enden überlappen, können auch die Erkennungssequenzen der bei der Kartierung und Sequenzierung eingesetzten

Endonukleasen im Sequenzgel dargestellt werden.

Da erfahrungsgemäß die Sequenzgelregion, die nur wenige Nukleotide von der 5'-Endmarkierung entfernt liegt, in einem 20%-Sequenzgel nicht immer absolut exakt gelesen werden kann, ist die Benutzung überlappender Fragmente vor allem bei der Sequenzierung eines Strukturgens, bei der Lesefehler sich katastrophal auswirken können, wichtig.

Große Subfragmente, wie das in dieser Arbeit benutzte 5'1--EcoRI B/XhoI E/BglII C/AvaI-1-Fragment (706 bp), brauchen nicht vollständig sequenziert zu werden, wenn für die weitere Sequenzierung andere Subfragmente zur Verfügung stehen.

Die 2. Methode, die als "Shotgun-Sequenzierung" bezeichnet wird, geht von der Gewinnung mehrerer Subfragmente bei nur einer Endonukleaseverdauung aus. Alle Subfragmente werden dann gemeinsam ^{32}P-endmarkiert und mit einer weiteren Endonuklease gespalten, oder es wird die Strangtrennung der endmarkierten Fragmente durchgeführt. Zumeist wird auf eine vorhergehende Restriktionsendonuklease-Kartierung verzichtet.

Die komplementären Sequenzen werden durch einen reziproken Prozeß erfaßt, d.h. die zur Spaltung eingesetzte Endonuklease wird nun zur Gewinnung der zu markierenden Fragmente und umgekehrt eingesetzt, wenn keine Strangtrennung durchgeführt werden soll. Die Sequenzen in komplementären Strängen können auch nach 3'-Endmarkierung mit $[\alpha^{32}P]$-ATP und Kalbsthymus-Terminaltransferase dargestellt werden.

Die "Kartierung" der homologen und überlappenden Fragmente ist bei der Shotgun-Sequenzierung oft nur unter Anwendung eines detaillierten Computerprogramms möglich, wie z.B. mit dem von Staden (1979) vorgeschlagenen Programm.

Ein zunächst offensichtlicher Vorteil der Shotgun-Sequenzierung liegt im Zeitgewinn. Eine große Zahl direkt sequenzierbarer Fragmente kann so an einem oder zwei Tagen gewonnen werden.

Hätte nun das Ad2 DBP-Gen durch Shotgun-Sequenzierung mit der gleichen Genauigkeit, aber wesentlich schneller sequenziert werden können?

Wenn man die Anzahl und die Positionen der Endonuklease-Schnittstellen im Ad2 EcoRI B-Fragment nach Gesamtkartierung des Ad2-Genoms auf ihre Verwendbarkeit für die Shotgun-Sequenzierung prüft, so wären doch wieder die BglII-Subfragmente, die mit hoher Aktivität zu kinasieren sind, am geeignetsten gewesen. Sie hätten mit BalI geschnitten werden können, wobei Subfragmente folgender Größe entstanden wären (berechnet aus der Gesamtkartierung):

1. EcoRI B/BglII D/BalI C : 70 bp
2. EcoRI B/BglII D/BalI J : 525 bp
3. BglII J/BalI J : 945 bp
4. BglII J/BalI K : 245 bp
5. EcoRI B/BglII C/BalI K : 700 bp
6. BalI P : 175 bp
7. EcoRI B/BglII C/BalI H : 1610 bp

BalI P wäre bei der Verdauung als nichtmarkiertes Fragment angefallen. Um es zu sequenzieren, hätte es erneut nach BglII- und BalI-Doppelverdauung von unmarkiertem EcoRI B isoliert, endmarkiert und asymmetrisch geschnitten, bzw. eine Strangtrennung durchgeführt werden müssen. Die glatten BalI-Enden lassen sich aber nicht gut endmarkieren.

Nur EcoRI B/BglII D/BalI C (70 bp) und BglII J/BalI K (245 bp) wären direkt sequenzierbar gewesen. Obwohl mit erhöhtem apparativen Aufwand bis zu 300 Nukleotide in einem Sequenzlauf gelesen werden können (Smith und Calvo, 1980), wären vor allem BglII J/BalI J (945 bp) und EcoRI B/BglII C/BalI H (1610 bp) für eine durchgehende vollständige Sequenzierung zu groß gewesen. Da also für diese Fragmente eine weitere Zergliederung auch bei Shotgun-Sequenzierung erforderlich gewesen wäre, hätte sie auch sofort mit einer Partialanalyse nach Smith und Birnstiel (1976) verbunden werden können.

Wie bereits erwähnt, ist bei der Sequenzierung eines Strukturgens die Visualisierung von Erkennungssequenzen der benutzten Endonuklease im Sequenzgelautoradiogramm erforderlich, um auch hier die Sequenz eindeutig festlegen zu können. Wird bei der Shotgun-Sequenzierung eine Strangtrennung erforderlich, wenn z.B. die Fragmente keine geeigneten Endonuklease-Schnitt-

stellen aufweisen, so können die 5'- und 3'-Termini der Einzelstrang-DNA-Fragmente nicht immer im Sequenzgel eindeutig festgelegt werden.

Nach Beendigung der Sequenzierungsarbeiten an einer definierten DNA tritt häufig der Fall ein, daß eine bestimmte Teilsequenz erneut bestimmt werden muß, weil dort noch Unsicherheiten vorhanden sind. Nach der Aufstellung einer Restriktionsendonukleasekarte und mit einer detaillierten Sequenzierungsstrategie kann spezifisch dieses Fragment gewonnen werden, zusätzlich fällt nur das am entgegengesetzten 5'-Ende endmarkierte doppelsträngige Fragment an. Wenn man das gesuchte Fragment mittels des Shotgun-Verfahrens isoliert, fallen wiederum zahlreiche endmarkierte Produkte an, und der Verbrauch von $[\alpha^{32}P]$-ATP oder $[\gamma^{32}P]$-ATP wird sehr hoch.

Das Shotgun-Verfahren schien also für die Sequenzierung des proteincodierenden Teils des Ad2 DBP-Gens nicht geeignet zu sein.

In Abschnitt II.1. des Ergebnisteils wurde berichtet, daß das für die Polyadenylierung der DBP mRNA höchstwahrscheinlich erforderliche Poly(A)-Additionssignal 5'-AATAAA-3' 135 Nukleotide von der AluI-Schnittstelle bei der Position 61,51 entfernt gefunden wurde.

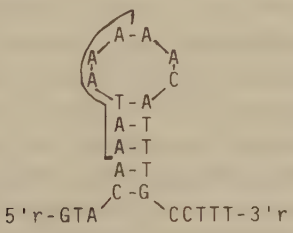
Nach der Aufstellung der gesamten Sequenz im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens wird das erste Nukleotid der Sequenz AATAAA bei der Nukleotidposition 211 lokalisiert. Das letzte Codonnukleotid für die carboxyterminale Aminosäure Phenylalanin befindet sich bei der Position 265 im r-Strang des Ad2 DBP-Gens. Die Sequenz AATAAA beginnt also 54 Nukleotide nach dem carboxyterminalen Aminosäurecodon im Ad2 DBP--Gen. Nach den Arbeiten von Proudfoot und Brownlee (1976) beginnt aber die eigentliche Anheftung des Poly(A)-Schwanzes 11 - 30 Nukleotide nach dem Auftreten des Poly(A)-Additionssignals.

Die Sequenz AAUAAA allein reicht aber vermutlich für die Polyadenylierung nicht aus, obwohl Fitzgerald und Shenk (1981) dazu berichtet haben, daß in einer Deletionsmutante von SV40

mit einer 16 bp Deletion, die die AAUAAA-Sequenz für späte SV40 mRNA einschloß, die Polyadenylierung der späten SV40 mRNA nicht ablaufen konnte. Es existieren auch AAUAAA-Sequenzen, die kein Signal zur Poly(A)-Addition geben, z.B. in der Mitte der frühen Region von SV40 DNA (Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978) und innerhalb der Transkriptionseinheit der frühen Region E1A von Adenovirus Typ 12 (Perricaudet et al., 1980b). Im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens tritt die Sequenz AATAAA aber kein zweites Mal im r-Strang auf.

Benoist et al. (1980) fanden ein Dekanukleotid 5'-TTTTCACTGC-3' an der Poly(A)-Anheftungsstelle in 5 von 9 untersuchten mRNAs. In der 3'-terminalen Region des r-Strangs des Ad2 DBP-Gens ist eine solche Sequenz nicht vorhanden.
Die Poly(A)-Addition könnte auch durch eine Kombination von Primär- und Sekundärstruktur am 3'-Ende einer mRNA eingeleitet werden, da die 3'-Regionen vieler mRNAs sich zu basengepaarten Strukturen falten können (Holland und Holland, 1979). Obwohl die Stabilität von Sekundärstrukturen am 3'-Ende von mRNAs gering ist (Tinoco et al., 1973), könnten Proteine die Haarnadelstrukturen stabilisieren.

Wenn man die dem 3'-Terminus der DBP mRNA homologen Sequenzen im r-Strang des Ad2 DBP-Gens daraufhin untersucht, fällt von den möglichen Haarnadelstrukturen eine besonders auf. Sie besitzt folgende Konfiguration:



Das erste basenpaarende Nukleotid vom 5'-Ende her liegt bei der Position 213, und das Poly(A)-Additionssignal AATAAA steuert 3 Nukleotide zu dem basengepaarten Stamm und 3 Nukleotide zu dem Loop bei, was durch die durchgehende Linie gezeigt wird. Diese Haarnadelkonfiguration ist die einzige in dieser Region des r-Strangs, die das Poly(A)-Additionssignal teilweise basengepaart enthält.

Alle anderen möglichen Haarnadelkonfigurationen in dieser Region besitzen weniger als 5 Basenpaarungen hintereinander und sind nicht durch einen Loop, sondern durch mehrere von ein bis vier Basenpaarungen umschlossenen, nicht basengepaarten Abschnitten charakterisiert.

Da in unserer Arbeitsgruppe die Sequenzierung einer cDNA-Kopie von reifer polysomaler Ad2 DBP mRNA vorangetrieben wird, können künftig wohl Daten über die genaue Lokalisierung der Poly(A)-Anheftung und evtl. auch über die Rolle dieser Sekundärstruktur erwartet werden.

Die nichtproteincodierenden Sequenzen am 3'-Ende einer mRNA sollen durch das Auftreten einer GC-reichen Region von 10 - 20 Basenpaaren, auf die dann eine AT-reiche Sequenz folgt, ausgezeichnet sein (Knippers, 1982). Im Ad2 DBP-Gen folgt nach dem Proteinterminationscodon TAA bei der Nukleotidposition 264 eine GC-reiche Sequenz, beginnend mit der Position 260, von 25 Nukleotidpaaren, die 20 GC-Paare enthält. Mit der Position 235 beginnt dann eine AT-reiche Sequenz von 30 Nukleotidpaaren, endend mit dem letzten Adenin des Poly(A)-Additionssignals der DBP mRNA bei der Position 206. Sie besitzt 21 AT-Basenpaare. Bezogen auf die DNA-Sequenz ist die Ad2 DBP mRNA also auch durch diese Nukleotidabfolge charakterisiert.

Die in dieser Arbeit aufgestellte Aminosäuresequenz des Ad2 DBPs wurde aus zwei Gründen ausdrücklich als hypothetisch bezeichnet. Zum einen sind die neben der Phosphorylierung zu erwartenden posttranslationellen Modifikationen des Ad2 DBP nicht bekannt. In einem Polypeptid, das wie das DBP 7,9 Mol% Prolin enthält, steht zu erwarten, daß einige Proline hydroxyliert werden können. Die Hydroxylierung von Prolinen ist von dem Faserprotein Kollagen, das 12 Mol% Prolin und 9 Mol% Hydroxyprolin enthält bekannt (Rich und Crick, 1961).

Hydroxyprolin ist aber nicht nur in Faserproteinen enthalten, denn aus Mücken der Gattung Acricotopus kann ein hydroxyprolinhaltiges sekretorisches Protein isoliert werden, das gebildet wird, wenn ein bestimmter spezifischer Puff in den

Speicheldrüsenchromosomen aktiviert wird (Von Sengbusch, 1979). Bei Glykoproteinen können Oligosaccharidanteile über Veresterung eines Arabinoserests mit Hydroxyprolin mit dem Proteinanteil verknüpft werden (Steck, 1974).

Prolin wird, nachdem es in die Polypeptidkette eingebaut wurde, durch das Enzym Prolylhydroxylase hydroxyliert. Prolylhydroxylase ist auf α-Ketoglutarat, Coenzym A, Vitamin C und Fe^{3+}-Ionen als Kofaktoren angewiesen (Cardinale und Udenfriend, 1974).

Eine mögliche Hydroxylierung von Prolinresten im Ad2 DBP könnte in vivo durch Immunkomplexbildung von Ad2 DBP mit Ad2 DBP-Antiserum und Prolylhydroxylase-Antiserum durch immunelektronenoptische Darstellung nachgewiesen werden, wenn die Reaktion 3 - 4 hpi erfolgt, d.h. solange die Hauptmenge an DBP noch nicht aus dem Cytoplasma in den Kern gewandert ist.

Neben der Phosphorylierung und Glykosylierung von Proteinen humaner DNA-haltiger Viren ist auch über die Sulfatierung von Aminosäuren in Proteinen, die nach Infektion von Zellen mit Herpes simplex Virus entstehen, berichtet worden (Erickson und Kaplan, 1973).

Die Aminosäuresequenz ist aber auch insofern hypothetisch, als eine Fehlbestimmung von nur einem Nukleotidpaar zur Änderung einer Aminosäure in der Sequenz führen kann. So zeigte W. Büttner (persönliche Mitteilung) eindeutig, daß im r-Strang des Ad2 DBP-Gens bei der Nukleotidposition 1785 anstelle eines Thymins ein Cytosin vorhanden ist. Das komplementäre Guanin in Gegenstrang ist ebenfalls vorhanden. Diese Korrektur ist in Abb. 18 bereits vorgenommen worden. Dadurch änderte sich das erste Codonnukleotid für den Aminosäurerest 23 im Ad2 DBP: Aus einem Serin wurde ein weiteres Prolin. Somit hat Ad2 DBP 42 Proline. In Abb. 24 war also als Rest 23 Prolin einzusetzen und zu unterstreichen. Eine weitere Konsequenz dieser Änderung war der Ausfall einer HphI-Erkennungssequenz zwischen den Positionen 1781 - 1785, hier lautet die Sequenz nun 5'l GGTGG-3'l. Dafür entstand aber eine neue AcyI-Erkennungssequenz im l-Strang: 1785-GA'CGTC-1790.

In diesem Zusammenhang muß auch unbedingt darauf hingewiesen werden, daß die Sequenz im proteincodierenden Teil des Ad2 DBP-Gens bei den Nukleotidpositionen 371 - 391 (21 Nukleotide), 513 - 523 (11 Nukleotide) 1109 -1113 (5 Nukleotide) und 1579 - 1698 (120 Nukleotide) nur im r-Strang bestimmt worden ist. Nur im l-Strang dagegen wurden die Sequenzen von den Nukleotidpositionen 1 - 75 (75 Nukleotide), 226 - 238 (13 Nukleotide), 863 - 880 (18 Nukleotide), 1374 - 1402 (29 Nukleotide) und 1698 - 1929 (232 Nukleotide) bestimmt.

Diese nur einzelsträngigen Sequenzen sind aber durch vergleichende Sequenzierung von 2, 3 oder sogar 4 verschiedenen Fragmentabschnitten des sequenzierten Strangs gut abgesichert worden. Auch sind die in diesen nur einzelsträngig sequenzierten Bereichen gefundenen Restriktionsendonuklease-Sequenzen, wie z.B. für AluI, HpaII, PstI, HinfI, HaeIII, BalI, SacII, NciI, KpnI, HphI, AvaI und NcoI bei weiteren analytischen und präparativen Verdauungen von Subfragmenten benutzt und ihre Existenz somit bestätigt worden.

Das virusspezifische DNA-Bindungsprotein, bzw. die DNA-Bindungsproteine, wenn man die 40 - 47kD Subspecies hinzurechnet, von Adenovirus Typ 2 gehören zu einer Klasse von Proteinen, deren erster Vertreter 1970 von Alberts und Frey aus mit dem Bacteriophagen T4 infizierten E.coli-Zellen isoliert wurde. Dieses Protein ist für die DNA-Replikation und die genetische Rekombination des Phagen erforderlich. Es bindet kooperativ an Einzelstrang-DNA, d.h. die Bindung weiterer Proteinmoleküle wird durch bereits am DNA-Einzelstrang gebundene Proteinmoleküle gefördert, und ist an der Denaturierung und Renaturierung der Phagen-DNA unter physiologischen Bedingungen in vitro beteiligt.

Das Gen 32 des Phagen T4 codiert für dieses Protein, weshalb es auch als T4 Gen 32 Protein bezeichnet wird. Eine Reihe anderer Bezeichnungen, wie "DNA-unwinding protein", "DNA--schmelzendes Protein" für das T4 Gen 32 Produkt führten zu einer Begriffsverwirrung, nachdem eine andere Klasse von Proteinen, die DNA-abhängigen ATPasen, in Prokaryoten gefunden worden waren. Diese Proteine sind als die tatsächlichen

"DNA-unwinding proteins" anzusehen, da sie die Hydrolyseenergie des ATP zur Auseinanderwicklung der DNA-Doppelhelix an der fortschreitenden Replikationsgabel benutzen.

Die DNA-abhängigen ATPasen können in zwei Gruppen gegliedert werden, DNA-Polymerase abhängige ATPasen und DNA-Helicasen. Zu den DNA-Polymerase abhängigen ATPasen gehören beispielsweise die Genprodukte der Gene 44/62 und 45 des Phagen T4 (Liu et al., 1979) und des Gens 4 des Phagen T7 (Hillenbrand et al., 1979).

DNA-Helicasen können die Stränge einer Duplex-DNA komplett dissoziieren, ohne auf die Aktivität anderer Enzyme angewiesen zu sein. Von den 4 aus E.coli isolierten DNA-Helicasen ist besonders die DNA-Helicase I interessant, denn sie ist ein Faserprotein mit einem Molekulargewicht von 180kD, das leicht mit sich selbst Aggregate bildet (Abdel-Monem et al., 1977). Es sei an die von Schechter et al. (1980) beschriebene Fähigkeit des Ad2 DBPs, Oligomere zu bilden, und an die in dieser Arbeit nach der Aminosäuresequenzanalyse formulierte Möglichkeit erinnert, daß Ad2 DBP in einer β-Konfiguration mit Faltblattstruktur vorliegt. Auch E.coli Helicase I bindet vor der Entfaltung seiner Aktivität an Einzelstrang-DNA ohne Beteiligung von ATP.

Durch den von Alberts und Sternglanz (1977) nach Konsultation der auf diesem Felde arbeitenden Forscher eingeführten Begriff "Helixdestabilisierende Proteine" (abg. HD-Proteine) für die DNA-Bindungsproteine vom Typ des T4 Gen 32 Proteins sollten diese Proteine von den DNA-abhängigen ATPasen abgegrenzt werden. Das Ad2 DBP müßte also Ad2 HD-Protein I genannt werden. In der Literatur ist man aber häufig bei der Bezeichnung DNA--Bindungsprotein geblieben.

Aus den Studien mit dem T4 Gen 32 Protein und dem E.coli-DNA--Bindungsprotein I (Champoux, 1978) ist bekannt, daß beide Proteine die DNA-Doppelhelix dadurch destabilisieren, daß sie die DNA-Einzelstränge in einer "extended configuration" halten. Van der Vliet et al. (1978) berichteten über die gleiche Erscheinung bei der Bindung von Ad2 DBP an Einzelstrang-DNA.

Strangstreckung und folgende Renaturierung ist aber nicht nur bei der DNA-Replikation, sondern auch bei der Rekombination erforderlich. Genetische Analysen zeigten dann auch, daß das T4 Gen 32 Protein für die Rekombination erforderlich ist (Kozinski und Felgenhauer, 1967). Eine Beteiligung des Ad2 DBPs an Rekombinationsereignissen ist meines Wissens bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

T4 Gen 32 Protein und E.coli DNA-Bindungsprotein I stimulieren in vitro ihre entsprechenden DNA-Polymerasen. Wirtspolymerasen werden vom T4 Gen 32 Protein nicht stimuliert, ebenso wenig stimuliert das E.coli DNA-Bindungsprotein I die T4 DNA--Polymerase, sondern nur die bakteriellen DNA-Polymerasen II und III (Kornberg, 1979).

Abboud und Horwitz (1979) teilten mit, daß die DNA-Replikation in Ad2 DNA-Replikationskomplexen aus infizierten HeLa-Kernen durch Dideoxythymidin-5'-triphosphat (DDTPP), einem Inhibitor der wirtszellspezifischen DNA-Polymerase γ, gehemmt wurde. Sie sprachen der DNA-Polymerase γ und, wie durch andere Experimente gezeigt werden konnte, auch der DNA-Polymerase α eine Beteiligung bei der DNA-Replikation von Ad2 zu.

In der Gegenwart von DNA-Polymerase β, ATP, allen vier dNTPs, $MgCl_2$ und adenoviralem DNA-Bindungsprotein konnte die DNA-Replikation von exogen zugesetzter Ad DNA durch den Zusatz einer Proteinfraktion aus dem Cytosol von adenovirusinfizierten HeLa-Zellen, die DNA-Polymerase α enthielt, gestartet werden. Die Replikation wurde durch Aphidicolin, einem Inhibitor der DNA-Polymerase α, gehemmt (Ikeda et al., 1981).

In diesen in vitro-Replikationssystemen wurde aber keine direkte Stimulation von DNA-Polymerasen durch Ad DBP nachgewiesen, obwohl diese Stimulation von DNA-Polymerasen durch Bindungsproteine aus Eukaryoten beschrieben worden ist (Duguet und de Recondo, 1978; Herrick et al., 1976; Novak und Beril, 1978). Zwischen den physikochemischen Eigenschaften - die Molekulargewichte eukaryotischer DNA-Bindungsproteine rangieren von 8,2kD bis 186kD - und der Spezifität bzw. dem Ausmaß der Stimulation von DNA Polymerasen kann keine Korrelation gefunden werden.

Bei der isoelektrischen Fokussierung von mit alkalischer Phosphatase partiell dephosphoryliertem Ad2 DBP traten 15 Subspecies mit unterschiedlichen Ladungen auf. Nach vollkommener Dephosphorylierung zeigten sich immer noch 2 oder 3 basische Subspecies. Nach Verfütterung von ^{32}P-Orthophosphat an Ad2-infizierte Zellen und quantitativer Immunpräzipitation ergab sich ein Phosphat-Protein-Verhältnis von 4 - 7 auf molarer Basis. Die direkte chemische Bestimmung der Phosphatreste am Ad2 DBP lieferte einen Wert von 4 Mol Phosphat/1 Mol Protein. Verschieden phosphorylierte Ad2 DBPs können also auch in vivo vorhanden sein (Linné und Philipson, 1980).

Die DNA-Bindungsproteine aus Mauszellen (30kD - 35kD) besitzen ebenfalls unterschiedliche Phosphorylierungsgrade. Nach Phosphorylierung ist die Bindung von Maus-DBPs an Doppelstrang-DNA reduziert, die Bindung an Einzelstrang-DNA wird jedoch nicht beeinträchtigt. Je nach dem Phosphorylierungsgrad von Maus-DBPs wird auch die Stimulation von DNA-Polymerase α reduziert (Otto et al., 1977).

Nach der klassischen Definition für DNA-Bindungsproteine binden diese spezifisch an Einzelstrang-DNA. Diese Auffassung muß revidiert werden, denn das 140kD-R-Protein aus sich im Stadium der Meiose befindlichen Zellen von Lilienarten (Hotta und Stern, 1979), das oben erwähnte Mauszell-DBP (Otto et al., 1977), das 8kD-DBP aus unbefruchteten Eiern von Xenopus laevis (Carrara et al., 1977), das 85kD-DBP aus HeLa-Zellkernen (Blue und Weissbach, 1978), das 80 -90kD-DBP aus dem Erreger des Beulenbrands des Mais, Ustilago maydis (Champ et al.,1978), und auch das Ad2 DBP binden an Doppelstrang-DNA.

Fowlkes et al. (1979) zeigten nach der Reaktion von Poly-[d(A-T)] mit DBP durch Schmelzanalysen, daß DBP eine feste, aber dissoziierbare Bindung mit dieser synthetischen Doppelstrang-DNA einging. Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ad2 DBP an die Termini dieser Doppelstrang-DNA liegen bei 1 - 2 x 10^{-9} Mol, wie durch Experimente mit Bindung des DNA-DBP-Komplexes an Filter gezeigt werden konnte.

Für das 80 - 90kD DBP aus Ustilago maydis, das ein Glykoprotein ist, ist eine Bindung an RNA beschrieben worden (Champ et al., 1978). Auch für das Ad2 DBP sollte nach einer Bindung an RNA gesucht werden, denn die Autoregulation der frühen Ad2 DBP mRNA-Synthese könnte durch eine Bindung von bereits synthetisiertem Ad2 DBP an DBP mRNA erfolgen (Blanton und Carter, 1979).

Die weitaus meisten Untersuchungen über die Funktion der adenoviralen DBPs von Serotypen der Untergruppe C sind mit ts--Mutanten von Ad5 vorgenommen worden. Aber auch Ad2 besitzt frühe ts-Mutanten, die eine Läsion im DBP-Gen besitzen können. Die frühe Ad2-Mutante H2ts201 kann nämlich den durch H5ts36 hervorgerufenen DNA-negativen Effekt, nicht aber den im DBP-Gen von H5ts125 liegenden Defekt komplementieren. Die Mutante H2ts206 komplementiert den durch H5ts36 und H5ts125 DNA-negativen Defekt, aber mit H2ts206 infizierte Zellen enthalten keine nachweisbaren Mengen an viraler mRNA (Kathmann et al., 1976).

Die Mutante ts63 des nicht defektiven Ad2-SV40-Hybridvirus $Ad2^{+}ND1$ synthetisiert bei nichtpermissiver Temperatur keine virale DNA und kann H5ts125 nicht komplementieren (Grodzicker et al., 1974). Zusammen mit den 4 Wirtsbereichsmutanten im Ad2 DBP-Gen (Ad2hr400-Ad2hr403) sollten die die entsprechenden Läsionen tragenden DNA-Fragmente durch detaillierte Marker--rescue-Experimente selektiert werden, um sie anschließend sequenzieren und die mutierte Aminosäure bestimmen zu können. Daß es sich bei Mutationen im DBP-Gen um Punktmutationen handeln kann, ist von Kruijer et al. (1981) für die Wirtsbereichsmutante H5hr404 von Adenovirus Typ 5 gezeigt worden: Die Aminosäure 130 im Ad5 DBP, Histidin, wird durch ein Tyrosin ersetzt.

Anderson und Lewis (1980) haben bereits die aminoterminalen Sequenzen einiger Ad2-spezifischer Proteine, wie des Hexons, der Fiber, des Strukturproteins IX und des frühen Proteins E1B-15k bestimmt. Nach ^{14}C-Carboxymethylierung ist die Reihenfolge der CNBr-Fragmente des Ad2 Hexons bestimmt und die Aminosäuresequenz in diesen Peptiden untersucht worden (Jörn-

vall und Von Bahr-Lindström, 1981; Jörnvall et al., 1981a, 1981b, 1981c).

Auch die Aminosäuresequenz des Ad2 DBPs sollte nach diesen Prinzipien festgelegt und mit der aus der Gensequenzierung abgeleiteten hypothetischen Aminosäuresequenz verglichen werden. Anschließend bestünde die Möglichkeit, durch Computersimulation Sekundär- und Tertiärstrukturen des Ad2 DBPs aufzustellen und ihre Eigenschaften mit der Funktion des Ad2 DBPs im lytischen Zyklus in Beziehung zu setzen (Robson und Osguthorpe, 1979).

F. ZUSAMMENFASSUNG

Das Genprodukt der frühen DNA-Region 2 des humanen Adenovirus Typ 2 ist ein DNA-Bindungsprotein, das bevorzugt an Einzelstrang-DNA bindet. Das relative Molekulargewicht des Ad2 DBP beträgt nach Bestimmung in der SDS-PAGE 72 000 Daltons. Das DBP, insbesondere seine carboxyterminale Domäne, ist an der Ad2 DNA-Replikation, aber auch an der Genexpression in der frühen und späten Phase des lytischen Zyklus beteiligt.

Die genetische Information für den Hauptkörper der DBP mRNA liegt im EcoRI B-Fragment der Ad2 DNA zwischen den Koordinaten 58,5 bis 70,7. Zur Charakterisierung der mRNA sind große Teile zweier BglII-Subfragmente des EcoRI B-Fragments nach der von Maxam und Gilbert beschriebenen Methode sequenziert worden.

Diese beiden Fragmente wurden mit wenigen Restriktionsendonukleasen kartiert, vorteilhaft war hier die Analyse von Partialverdauungsprodukten nach Smith und Birnstiel. Besonders geeignet waren jene Endonukleasen, die Subfragmente von bereits sequenzierbarer Länge, d.h. von 200 bis 400 Nukleotidpaaren, erzeugten. Die wesentlichsten zur Sequenzierung eingesetzten Endonukleasen waren AvaI, HinfI, HpaII, AluI und HaeIII. Mit fortschreitender Sequenzierung wurden Erkennungssignale weiterer Endonukleasen gefunden, die nun ihrerseits für die Präparation neuer Fragmente benutzt werden konnten.

Alle zur Sequenzierung eingesetzten Fragmente wurden nach der Wiedergewinnung und Reinigung mit $[\gamma^{32}P]$-ATP mittels der Polynukleotidkinasereaktion an beiden 5'-Positionen endmarkiert und danach mit einer weiteren Endonuklease asymmetrisch geschnitten. Nach der Auftrennung der endmarkierten Fragmente in Polyacrylamidgelen, Wiedergewinnung und Reinigung wurden sie unmittelbar der partiellen chemischen Degradation unterworfen, auf 8%- bzw. 20%-Polyacrylamid-Harnstoffgelen getrennt und autoradiographiert.

Wo immer es möglich war, wurden beide Stränge eines Subfragments sequenziert. Die Erkennungssequenzen bereits eingesetzter Endonukleasen wurden durch die Analyse weiterer Fragmente, die diese Signale überlappten, gesichert. Ausgehend von

ganz unterschiedlichen Fragmenten und sekundären Spaltungen sind etliche Bereiche 2 - 3mal sequenziert worden. Die beim 1. Sequenzierungsgang gefundenen Sequenzen ließen sich so bestätigen, oft aber auch eindeutig korrigieren.

Nach der Sequenzanalyse von 1929 Nukleotiden konnte die Primärstruktur des Ad2 DBP-Gens ermittelt werden. Sowohl im r- als auch im l-Strang sind die Sequenzen auf das Vorkommen von Proteininitiations- und Proteinterminationscodons in den drei möglichen Leserastern untersucht worden. Die DBP mRNA ist dem r-Strang homolog und es gibt hier nur einen offenen Leseraster. Er umfaßt 1587 Nukleotidpaare, mithin kann für 529 Aminosäuren codiert werden. Die hypothetische Aminosäuresequenz des DBP wurde unter Verwendung des genetischen Universalcodes aufgestellt.

Auf DNA-Ebene befindet sich das Methionin-Initiationscodon ATG bei der Position 1851 mit dem Terminationscodon TAA bei der Position 264. Nach der hier aufgestellten Aminosäuresequenz beträgt das Molekulargewicht des Ad2 DBP 59 069 Daltons. 54 Nukleotide nach dem carboxyterminalen Aminosäurecodon im r-Strang befindet sich dann das Poly(A)-Additionssignal der DBP mRNA.

Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz und alle akzessorischen Daten wurden auf einer Diskette am Terminal des Rechenzentrums gespeichert. Mit einem terminalinternen Programm zur "string"--Erkennung und Zeichenersetzung wurden die Erkennungssequenzen von Endonukleasen der Klasse II und weiterer genetischer Signale auf der DNA bestimmt.

G. LITERATUR

Abboud, M.M.; Horwitz, M.S. — The DNA polymerases associated with the adenovirus type 2 replication complex: Effect of 2',3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate on viral DNA synthesis. Nucl. Acids Res. 6 (1979): 1025-1039

Abdel-Monem, M.; Lauppe, H.-F.; Kartenbeck, J.; Dürwald, H.; Hoffmann-Berling, H. — Enzymatic unwinding of DNA. III. Mode of action of Escherichia coli DNA unwinding enzyme. J. Mol. Biol. 110 (1977): 667-685

Adamkiewicz, J.; Veres-Molnar, Z.; Büttner, W.; — Mapping of the EcoRI B fragment-specific early mRNA species of adenovirus type 2. FEBS-Letters 94 (1978): 199-203

Akusjärvi, G.; Mathews, M.B.; Andersson, P.; Vennström, B.; Pettersson, U. — Structure of genes for virus-associated RNAI and RNAII of adenovirus type 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980): 2424-2428

Akusjärvi, G.; Pettersson, U. — Sequence analysis of adenovirus DNA.IV.The genomic sequences encoding the common tripartite leader of late adenovirus messenger RNA. J. Mol. Biol. 134 (1979):143-158

Akusjärvi, G.; Zabielski, J.; Perricaudet, M.; Pettersson, U. — The sequence of the 3' non-coding region of the hexon mRNA discloses a novel adenovirus gene. Nucl. Acids Res. 9 (1981):1-17

Alberts, B.M.; Frey, L. — T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. Nature 227 (1970): 1313-1318

Alberts, B.M.; Herrick, G. — DNA-Cellulose chromatography, in: Methods Enzymol. (Grossman, L. and Moldave, K., eds.), Vol. 21, pp. 198-217; Academic Press, New York, 1971

Alberts, B.; Sternglanz, R. — Recent excitement in the DNA replication problem. Nature 269 (1977): 655-661

Aleström. P.; Akusjärvi, G. Parricaudet, M.; Mathews, M.B.; Klessig, D.F.; Pettersson, U. — The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA. Cell 19 (1980): 671-681

Anderson, C.W.; Lewis, J.B. Amino-terminal sequence of adenovirus type 2 proteins: Hexon, fiber, component IX, and early protein 1B-15k. Virology 104 (1980): 27-41

Ariga, H.; Klein, H.; Levine, A.J.; Horwitz, M.S. A cleavage product of the adenovirus DNA binding protein is active in DNA replication in vitro. Virology 101 (1980): 307-310

Arrand, J.R.; Keller, W.; Roberts, R.J. Extent of terminal repetition in adenovirus 2 DNA. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 401-407

Axelrod, N. Phosphoproteins of adenovirus 2. Virology 87 (1978): 366-383

Baker, C.C.; Hérissé, J.; Courtois, G.; Galibert, F.; Ziff, E. Messenger RNA for the Ad2 DNA binding protein: DNA sequences encoding the first leader and heterogenity at the mRNA 5'end. Cell 18 (1979): 569-580

Baron, F.; Brown, D.M. Nucleotides. Part XXXIII. The structure of cytidylic acids a and b. J. Chem. Soc. (1955): 2855-2860

Benoist, C.; O'Hare, K.; Breathnach, R.; Chambon, P. The ovalbumin gene - sequence of putative control regions. Nucl.Acids Res. 8 (1980): 127-142

Berget, S.M.; Berk, A.J.; Harrison, T.; Sharp, P.A. Spliced segments at the 5' termini of adenovirus-2 late mRNA: A role for heterogeneous nuclear RNA in mammalian cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42 (1977a): 523-529

Berget, S.M.; Moore, C.; Sharp, P.A. Spliced segments at the 5'-terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977b): 3171-3175

Berk, A.J.; Sharp, P.A. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease--digested hybrids. Cell 12 (1977): 721-732

Berk, A.J.; Sharp, P.A. — Structure of the Adenovirus 2 early mRNAs. Cell 14 (1978): 695-711

Bigelow, C.C.; Channon, M. — Hydrophobicities of amino acids and proteins. in: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd edition: Proteins Vol. 1 (G.D. Fasman, ed.), pp. 209-243, CRC Press, Cleveland 1976

Blanchard, J.M.; Weber, J.; Jelinek, W.; Darnell, J.E. — In vitro RNA-RNA splicing in adenovirus 2 mRNA formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978): 5344-5348

Blanton, R.A.; Carter, T.H. — Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. III. Transcription studies in isolated nuclei. J. Virol. 29 (1979): 458-465

Blue, W.T.; Weissbach, A. — Detection of a DNA polymerase β stimulating protein in HeLa cell nuclear extracts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 84 (1978): 603-610

Bolivar, F.; Rodriguez, R.L. Greene, P.J.; Betlach, M.C.; Heynecker, H.L.; Boyer, H.W.; Crosa, J.H.; Falkow, S. — Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2 (1977): 95-113

Booth, M.R.; Ewart, J.A.D. — Studies on four components of wheat gliadins. Biochim. Biophys. Acta 181 (1969): 226-233

Borgman, J. — Lineares Thermometer, Halbleiter-Diode als Temperatur-Sensor. Elektor 114 (1980): 34-37

Breathnach, R.; Benoist, C.; O'Hare, K.; Gannon, F.; Chambon, P. — Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978): 4853-4857

Brown, N.L.; Smith, M. — The sequence of aregion of bacteriophage ØX174 DNA coding for parts of genes A and B. J. Mol. Biol. 116 (1977): 1-30

Büttner, W.; Veres-Molnár, Z.; Green, M. Isolation of DNA strand-specific early messenger RNA species in cells infected by human adenovirus 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974): 2951-2955

Büttner, W.; Veres-Molnár, Z.; Green, M. Preparative isolation and mapping of adenovirus 2 early messenger RNA species. J. Mol. Biol. 107 (1976): 93-114

Büttner, W.; Veres-Molnár, Z. Localization of the 3'-terminal end of the EcoRI B fragment-specific early mRNA of adenovirus type 2. FEBS Letters 122 (1980): 317-321

Cardinale, G.J.; Udenfriend, S. Prolyl hydroxylase. Advan. Enzymol. 41 (1974): 245-300

Carrara, G.; Gattoni, S.; Mercanti, D.; Tocchini-Valentini, G.P. Purification of a DNA-binding protein from Xenopus laevis unfertilized eggs. Nucl.Acids Res. 4 (1977): 2855-2870

Carter, T.H.; Blanton, R.A. Possible role of the 72,000 Dalton DNA-binding protein in regulation of adenovirus type 5 early gene expression. J. Virol. 25 (1978): 664-674

Cashmore, A.R.; Petersen, G.B. The degradation of DNA by hydrazine: identification of 3-ureidopyrazole as a product of the hydrazinolysis of deoxycytidylic acid residues. Nucl. Acids Res. 5 (1978): 2485-2491

Challberg, M.D.; Desiderio, S.V.; Kelly, T.J. jr. Adenovirus DNA replication in vitro: Characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980): 5105-5109

Challberg, M.D.; Kelly, T.J. jr. Processing of the adenovirus terminal protein. J. Virol. 38 (1981): 272-277

Champ, D.R.; Unrau, P.; Grant, C.E.; Young, J.L.
Nucleic acid binding glycoproteins which solubilize deoxyribonucleic acid in dilute acid: Species distribution and possible role in DNA condensation.
in: DNA Synthesis, Present and Future (I. Molineux, M. Koliyama, eds.), p.p. 409-422, Plenum Press, New York, 1978

Champoux, J.J.
Proteins that affect DNA conformation.
Ann. Rev. Biochem. 47 (1978): 449-479

Chow, L.T.; Broker, T.R.:
The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs.
Cell 15 (1978): 497-510

Chow, L.T.; Broker, T.R.; Lewis, J.B.
Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2.
J. Mol. Biol. 134 (1979): 265-303

Chow, L.T.; Gelinas, R.E.; Broker, T.R.; Roberts, R.J.
An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA.
Cell 12 (1977): 1-8

Craig, E.A.; Raskas, H.J.
Effect of cycloheximide on RNA metabolism early in productive infection with adenovirus 2.
J. Virol. 14 (1974): 26-32

Dales, S.; Chardonnet, Y.
Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum.
Virology 56 (1973): 465-483

Daniell, E.
Genome structure of incomplete particles of adenovirus.
J. Virol. 19 (1976): 685-708

Duguet, M; deRecondo, A.M.
Deoxyribonucleic acid unwinding protein isolated from regenerating rat liver.
J. Biol. Chem. 253 (1978): 1660-1666

Dunn, A.R.; Hassell, J.A. — A novel method to map transcripts: Evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome. Cell 12 (1977): 23-36

Eggerding, F.; Raskas, H.J. — Regulation of an early RNA transcribed from the transforming segment of the adenovirus 2 genome. Virology 91 (1978): 312-320

Enders, J.F.; Bell, J.A.; Dingle, J.H.; Francis, T.; Hilleman, M.R.; Huebner, R.J. Payne, A.M.-M. — "Adenoviruses": Group name proposed for new respiratory-tract viruses. Science 124 (1956): 119-120

Ensinger, M.J.; Ginsberg, H.S. — Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenoviruses. J. Virol. 10 (1972): 328-339

Erickson, J.S.; Kaplan, A.S. — Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus. IX. Sulfated proteins. Virology 55 (1973): 94-102

Fiers, W.; Contreras, R.; Haegeman, G.; Rogiers, R.; Van de Voorde, A.; Van Heuverswyn, H.; Van Herreweghe, J.; Volckaert, G.; Ysebaert, M. — Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. Nature 273 (1978): 113-120

Fitzgerald, M.; Shenk, T. — The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. Cell 24 (1981): 251-260

Flint, S.J.; Beltz, G.A. — Expression of transforming viral genes in semipermissive cells transformed by SV40 or adenovirus type 2 or type 5. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44 (Pt 1) (1980): 89-102

Flint, S.J.; Sambrook, J.; Williams, J.; Sharp, P.A. — Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5-transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome. Virology 72 (1976): 456-470

Fowlkes, D.M.; Lord, S.T.; Linné, T.; Pettersson, U.; Philipson, L.
Interaction between the adenovirus DNA-binding protein and double-stranded DNA.
J. Mol. Biol. 132 (1979): 163-180

Freeman, A.E.; Black, P.H.; Vanderpool, E.A.; Henry, P.H.; Austin, J.B.; Huebner, R.J.
Transformation of primary rat embryo cells by adenovirus type 2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58 (1967): 1205-1212

Fujinaga, K.; Mak, S.; Green, M.
A method for determining the fraction of the viral genome transcribed during infection and its application to adenovirus-infected cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60 (1968): 959-966

Galibert, F.; Hérissé, J.; Courtois, G.
Nucleotide sequence of the EcoRI F fragment of adenovirus 2 genome.
Gene 6 (1979): 1-22

Galos, R.S.; Williams, J.; Binger, M.H.; Flint, S.J.
Location of additional early gene sequences in the adenoviral genome.
Cell 17 (1979): 945-956

Gelinas, R.E.; Roberts, R.J.
One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs.
Cell 11 (1977): 533-544

Gilead, Z.; Sugawara, K.; Shanmugan, G.; Green, M.
Synthesis of the adenovirus--coded DNA binding protein in infected cells.
J. Virol. 18 (1976): 454-460

Ginsberg, H.S.; Lundholm, U.; Linné, T.
Adenovirus DNA-binding protein in cells infected with wild--type 5 adenovirus and two DNA-minus, temperature-sensitive mutants, H5ts125 and H5ts149.
J. Virol. 23 (1977): 142-151

Ginsberg, H.S.; Pereira, H.G.; Valentine, R.C.; Wilcox, W.C.
A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits.
Virology 28 (1966): 782-783

Goff, S.P.; Rambach, A.
SstI: A Restriction endonuclease from Streptomyces sp. STANFORD.
Gene 3 (1978): 347-352

Goldberg, S.; Nevins, J.; Darnell, J.E. Evidence from UV transcription mapping that late adenovirus type 2 mRNA is derived from a large precursor molecule. J. Virol. 25 (1978): 806-810

Goldenberg, C.J.; Raskas, H.J. Splicing patterns of nuclear precursors to the mRNA for adenovirus 2 DNA binding protein. Cell 16 (1979): 131-138

Goldenberg, C.J.; Raskas, H.J. In vitro processing of intervening sequences in the precursors of messenger ribonucleic acid for adenovirus 2 deoxyribonucleic acid binding protein. Biochemistry 19 (1980): 2719-2723

Goldenberg, C.J.; Rosenthal, R.; Bhaduri, S.; Raskas, H.J. Coordinate regulation of two cytoplasmic RNA species transcribed from early region 2 of the adenovirus 2 genome. J. Virol. 38 (1981): 932-939

Graham, F.L.; Harrison, T.; Williams, J. Defective transforming capacity of adenovirus type 5 host-range mutants. Virology 86 (1978): 10-21

Green, M. Oncogenic Viruses. Ann. Rev. Biochem. 39 (1970): 701-756

Green, M. Search for adenovirus messenger RNA in cancers of man. in: Oncology (R.L. Clark, R.W. Cumley, J.E. McCay, M.M. Copeland, eds.), Vol. 5, pp. 156-165; Yearbook Chicago 1971

Green, M.; Pina, M; Kimes, R.; Wensink, P.C.; Machattie, L.A.; Thomas, C.A. Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 (1967): 1302-1309

Green, M.; Mackey, J.K.; Wold, W.S.; Rigden, P. Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) from five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. Virology 93 (1979a): 581-492

Green, M.; Wold, W.S.
Human adenoviruses: Growth, purification and transfection assay.
Methods Enzymol. 58 (1979): 425-435

Green, M.; Wold, W.S.; Brackmann, K.H.; Cartas, M.A.
The 55k protein on the 5' termini of adenovirus type 2 DNA is unrelated to virus-coded candidate transformation proteins (E1-53k, E1-40k-50k) and DNA-binding proteins (E2-42k/47k/73k).
J. Virol. 31 (1979b): 836-840

Grodzicker, T.; Anderson, C.; Sambrook, J.; Mathews, M.B.
The physical locations of structural genes in adenovirus DNA.
Virology 80 (1977): 111-126

Grodzicker, T.; Williams, J.; Sharp, P.; Sambrook, J.
Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 439-446

Halbert, D.N.; Spector, D.J.; Raskas, H.J.
In vitro translation products specified by the transforming region of adenovirus type 2.
J. Virol. 31 (1979): 621-629

Harter, M.L.; Lewis, J.B.
Adenovirus Type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo: Identification in infected cells of the 38,000- to 50,000 molecular-weight protein encoded by the left end of the adenovirus type 2 genome.
J. Virol. 26 (1978): 736-749

Harter, M.L.; Lewis, J.B.; Anderson, C.W.
Adenovirus type 2 terminal protein: Purification and comparison of tryptic peptides with known adenovirus-coded proteins.
J. Virol. 31 (1979): 823-835

Hashimoto, S.; Pursley, M.H.; Green, M.
Nucleotide sequences and mapping of novel heterogeneous 5'-termini of adenovirus 2 early region 4 mRNA.
Nucl. Acids Res. 9 (1981): 1675-1689

Hashimoto, S.; Green, M. Methylated 5'-terminal caps of adenovirus type 2 early mRNA: Evidence for at least six 5'-termini. Virology 94 (1979): 254-272

Hayward, G.S. Gel electrophoretic separation of the complementary strands of bacteriophage DNA. Virology 49 (1972): 342-344

Hérissé, J.; Courtois, G.; Galibert, F. Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome. Nucl. Acids Res. 8 (1980): 2173-2192

Herrick, G.; Delius, H.; Alberts, B. Single-stranded DNA structure and DNA polymerase activity in the presence of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus. J. Biol. Chem. 251 (1976): 2142-2146

Hilleman, M.R.; Werner, J.H. Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85 (1954): 183-188

Hillenbrand, G.; Merelli, G.; Lauka, E.; Scherzinger, E. Bacteriophage T7 DNA primase: A multifunctional enzyme involved in DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (1979): 449-459

Holland, J.P.; Holland, M.J. The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 254 (1979): 9839-9845

Horwitz, M.S. Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978): 4291-4295

Hotta, Y.; Stern, H. The effect of dephosphorylation on the properties of a helix-destabilizing protein from meiotic cells and its partial reversal by a protein kinase. Eur. J. Biochem. 95 (1979): 31-38

Houston, L.L. — Amino acid analysis of stained bands from polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 44 (1971): 81-88

Huebner, R.J.; Rowe, W.P.; Lane, W.T. — Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962): 2051-2058

Ikeda, J.E.; Enomoto, T.; Hurwitz, J. — Replication of adenovirus DNA--protein complex with purified proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981): 884-888

Isenberg, I. — Histones. Ann. Rev. Biochem. 48 (1979): 159-191

Jeng, Y.-H.; Wold, W.S.; Sugawara, K.; Gilead, Z.; Green, M. — Adenovirus type 2 coded single--stranded DNA binding protein: In vivo phosphorylation and modification. J. Virol. 22 (1977): 402-411

Jörnvall, H.; Von Bahr-Lindström, H. — Fractionation of CNBr fragments and primary structures of peptides of the adenovirus hexon protein. J. Biol. Chem. 256 (1981): 6187-6198

Jörnvall, H.; Akusjärvi, G.; Aleström, P.; Von Bahr-Lindström, H.; Pettersson, U.; Appella, E.; Fowler, A.V.; Philipson, L. — The adenovirus hexon protein. The primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. J. Biol. Chem. 256 (1981a): 6181-6186

Jörnvall, H.; Appella, E.; Fowler, A.V.; Von Bahr-Lindström, H. — Structural analysis of four large CNBr fragments from [14C]--carboxymethylated adenovirus hexon protein. J. Biol. Chem. 256 (1981b): 6199-6203

Jörnvall, H.; Aleström, P.; Akusjärvi, G.; Von Bahr-Lindström, H.; Philipson, L.; Pettersson, U. — Order of the CNBr fragments in the adenovirus hexon protein. J. Biol. Chem. 256 (1981c): 6204-6212

Kaplan, L.M.; Ariga, H.; Hurwitz, J.; Horwitz, M.S. — Complementation of the temperature-sensitive defect in H5ts125 adenovirus DNA replication in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979): 5534-5538

Kathmann, P.; Schick, J.; Winnacker, E.L.; Doerfler, W. — Isolation and characterization of temperature sensitive mutants of adenovirus type 2. J. Virol. 19 (1976): 43-53

Kedinger, C.; Brison, O.; Perrin, F.; Wilhelm, J. — Structural analysis of viral replicative intermediates isolated from adenovirus type 2-infected HeLa cell nuclei. J. Virol. 26 (1978): 364-379

Kempe, T.D.; Beattie, W.G.; Weissman, S.; Konigsberg, W. — Correlation of the protein and nucleic acid sequences for the major structural protein of Simian Virus 40. J. Biol. Chem. 254 (1979): 7561-7569

Kitchingman, G.R.; Lai, S.-P.; Westphal, H. — Loop structures in hybrids of early RNA and the separated strands of adenovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977): 4392-4395

Klessig, D.F. — Two adenovirus mRNAs have a common 5' terminal leader sequence encoded at least 10 kb upstream from their main coding regions. Cell 12 (1977): 9-21

Klessig, D.F.; Grodzicker, T. — Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72k DNA binding protein. Cell 17 (1979): 957-966

Knippers, R. — Molekulare Genetik, 3. Aufl. p. 120 Thieme, Stuttgart, New York, 1982

Kochetkov, N.K.; Budowskii, E.I. — Reactions involving the cleavage or regrouping of heterocyclic rings of the bases of nucleic acids and their derivates. III. Cleavage by the action of hydrazine.

in: Organic Chemistry of Nucleic Acids, Part B (N.K. Kochetkov, E.I. Budowskii, eds.), pp. 401-408
Plenum Press, New York, 1972

Konkel, D.A.; Tilghman, S.M. Leder, P.
The sequence of the chromosomal mouse β-globin major gene: Homologies in capping, splicing and poly(A) sites.
Cell 15 (1978): 1125-1132

Kornberg, A.
Aspects of DNA replication.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (1979): 1-19

Kozak, M.
Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes.
Nucl. Acids Res. 9 (1981): 5233-5252

Kozinski, A.W.
Felgenhauer, Z.Z.
Molecular recombination in T4 bacteriophage deoxyribonucleic acid. II. Single strand breaks and exposure of uncomplemented areas as a prerequisite for recombination.
J. Virol. 1 (1967): 1193-1202

Kruijer, W.; Van Schaik, F.M.A.; Sussenbach, J.S.
Structure and organization of the gene coding for the DNA binding protein of adenovirus type 5.
Nucl. Acids Res. 9 (1981): 4439-4457

Kvist, S.; Östberg, L.; Persson, H.; Philipson, L.; Peterson, P.A.
Molecular association between transplantation antigens and cell surface antigen in adenovirus-transformed cell line.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978): 5674-5678

Landgraf-Leurs, M.; Green, M.
Adenovirus DNA III. Separation of the complementary strands of adenovirus types 2, 7 and 12 DNA molecules.
J. Mol. Biol. 60 (1971): 185-202

Laver, W.G.; Pereira, H.G.; Russell, W.G.; Valentine, R.C.
Isolation of an internal component from adenovirus type 5.
J. Mol. Biol. 37 (1968): 379-386

Lawley, P.D.; Brookes, P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. Biochem. J. 89 (1963): 127-138

Lee, A.S.; Sinsheimer, R.L. A cleavage map of bacteriophage ØX174 genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974): 2882-2886

Lerner, M.R.; Boyle, J.A.; Mount, S.M.; Wolin, S.L.; Steitz, J.A. Are snRNPs involved in splicing? Nature 283 (1980): 220-224

Levinson, A.D.; Levine, A.J.; Anderson, S.; Osborn, M.; Rosenwirth, B.; Weber, K. The relationship between group C adenovirus tumour antigen and the adenovirus single-strand DNA-binding protein. Cell 7 (1976): 575-584

Levinson, A.D.; Postel, E.H.; Levine, A.J. In vivo and in vitro phosphorylation of the adenovirus type 5 single-strand-specific DNA-binding protein. Virology 79 (1977): 144-159

Lewis, J.B.; Anderson, C.W.; Atkins, J.F.; Gesteland, R.F. The origin and destiny of adenovirus proteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 581-590

Lewis, J.B.; Anderson, C.W.; Atkins, J.F. Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments. Cell 12 (1977): 37-44

Lewis, J.B.; Atkins, J.F.; Baum, P.R.; Solem, R.; Gesteland, R.F.; Anderson, C.W. Location and identification of the genes for adenovirus type 2 early polypeptides. Cell 7(1976): 141-151

Lewis, J.B.; Esche, H.; Smart, J.E.; Stillman, B.W.; Harter, M.L.; Mathews, M.B. Organization and expression of the left third of the genome of adenovirus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44 (Pt1) (1980): 493-508

Lillehaug, J.R.; Kleppe, R.K.; Kleppe, K. Phosphorylation of double-stranded DNAs by T4 polynucleotide kinase. Biochemistry 15 (1976): 1858-1865

Linné, T.; Jörnvall, H.; Philipson, L.
Purification and characterization of the phosphorylated DNA-binding protein from adenovirus type 2-infected cells. Eur. J. Biochem. 76 (1977): 481-490

Linné, T.; Philipson, L.
Further characterization of the phosphate moiety of the adenovirus type 2 DNA binding proteine. Eur. J. Biochem. 103 (1980): 259-270

Liu, C.C.; Burke, R.L.; Hibner, U.; Barry, J.; Alberts, B.
Probing DNA replication mechanisms with the T4 bacteriophage in vitro system. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (1979): 469-487

Lonberg-Holm, K.; Philipson, L.
Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system. J. Virol. 4 (1969): 323-338

Maniatis, T.; Jeffrey, A.; Van de Sande, H.
Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry 14 (1975): 3787-3794

Mathews, M.B.
Binding of adenovirus VA RNA to mRNA: A possible role in splicing? Nature 285 (1980): 575-577

Mathews, M.B.; Pettersson, U.
The low molecular weight of RNAs of adenovirus 2-infected cells. J. Mol. Biol. 119 (1978): 293-328

Maxam, A.M.; Gilbert, W.
A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977): 560-564

Maxam, A.M.; Gilbert, W.
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65 (1980): 499-560

Myers, M.W.; Laughlin, C.A.; Jay, F.T.; Carter, B.J.
Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: Effect of temperature--sensitive mutations in adenovirus early gene region 2.
J. Virol. 35 (1980): 65-75

Nass, K.; Frenkel, G.D.
A deoxyribonucleic acid binding protein from KB cells which inhibits deoxyribonuclease activity on single-stranded DNA.
J. Biol. Chem. 254 (1979): 3407-3410

Nass, K.; Frenkel, G.D.
Adenovirus-specific DNA-binding protein inhibits the hydrolysis of DNA by DNase in vitro.
J. Virol. 35 (1980): 314-319

Nei, M.; Li, W.-H.
Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979): 5269-5273

Nevins, J.R.; Blanchard, J.M.; Darnell, J.E. jr.
Transcription units of adenovirus type 2. Termination of transcription beyond the poly(A)--addition site in early regions 2 and 4.
J. Mol. Biol. 144 (1980): 377-386

Nevins, J.R.; Winkler, J.J.
Regulation of early adenovirus transcription: A protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980): 1893-1897

Novak, B.; Baril, E.F.
HeLa DNA polymerase α activity in vitro: specific stimulation by a non-enzymic protein factor.
Nucl. Acids Res. 5 (1978): 221-239

Nozaki, Y.; Tanford, C.
The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale.
J. Biol. Chem. 246 (1971): 2211-2217

Otto, B.; Baynes, M.; Knippers, R.
A single-strand-specific DNA--binding protein from mouse cells that stimulates DNA polymerase.
Eur. J. Biochem. 73 (1977): 17-24

Parsons, J.T.; Green, M.
Biochemical studies on adenovirus multiplication XVIII. Resolution of early virus-specific RNA species in Ad2 infected and transformed cells.
Virology 45 (1971): 154-162

Peacock, A.C.; Dingman, C.W.
Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochemistry 6 (1967): 1818-1827

Pearson, G.D.; Hanawalt, P.C.
Isolation of DNA replication complexes from uninfected and adenovirus-infected HeLa cells.
J. Mol. Biol. 62 (1971): 65-80

Pereira, H.G.; Huebner, R.J. Ginsberg, H.S.; Van der Veen, J.
A short description of the adenovirus group.
Virology 20 (1963): 613-620

Perricaudet, M.; LeMoullec, J.M.; Pettersson, U.
Predicted structure of two adenovirus tumor antigens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980a): 3778-3782

Perricaudet, M.; LeMoullec, J.M.; Tiollais, P.; Pettersson, U.
Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications.
Nature 288 (1980b): 174-176

Persson, H.; Jörnvall, H.; Zabielski, J.
Multiple mRNA species for the precursor to an adenovirus-encoded glycoprotein: Identification and structure of the signal sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980): 6349-6353

Persson, H.; Mathisen, B.; Philipson, L.; Pettersson, U.
A maturation protein in adenovirus morphogenesis.
Virology 93 (1979): 198-208

Persson, H.; Öberg, B.; Philipson, L.;
Purification and characterization of an early protein (E14k) from adenovirus type 2-infected cells.
J. Virol. 28 (1978a): 119-139

Persson, H.; Pettersson, U.; Mathews, M.B. Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of viral DNA replication. Virology 90 (1978b):67-79

Pettersson, U. Some unusal properties of replicating adenovirus type 2 DNA. J. Mol. Biol. 81 (1973): 521-527

Pettersson, U.; Höglund, S. Structural proteins of adenoviruses. III. Purification and characterization of adenovirus type 2 penton antigen. Virology 39 (1969): 90-106

Pettersson, U.; Mathews, M.B. The gene and messenger RNA for adenovirus polypeptide IX. Cell 12 (1977): 741-750

Pettersson, U.; Philipson, L.; Höglund, S. Structural proteins of adenoviruses. II. Purification and characterization of adenovirus type 2 fiber antigen. Virology 35 (1968): 204-215

Pettersson, U.; Tibbetts, C.; Philipson, L. Hybridization maps of early and late messenger RNA sequences on the adenovirus type 2 genome. J. Mol. Biol. 101 (1976): 479-501

Philipson, L.; Pettersson, U.; Lindberg, U.; Tibbetts, C.; Vennström, B.; Persson, T. RNA synthesis and processing in adenovirus-infected cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 447-456

Philipson, L.; Wall, R.; Glickman, G.; Darnell, J.E. Addition of polyadenylate sequences to virus-specific RNA during adenovirus replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971): 2806-2809

Pina, M.; Green, M. Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54 (1965): 547-551

Pribnow, D. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975): 784-788

Proudfoot, N.J.; Brownlee, G.G. 3'-non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263 (1976): 211-214

Raptis, L.H.; Bourgaux, P. Two classes of replicating molecules of adenovirus type 2 DNA. Biochim. Biophys. Acta 653 (1981): 331-343

Reddy, V.B.; Thimmappaya, B.; Dhar, R.; Subramanian, K.N.; Zain, B.S.; Pan, J.; Ghosh, P.K.; Celma, M.L.; Weissman, S.M. The genome of simian virus 40. Science 200 (1978): 494-502

Rekosh, D.M.; Russell, W.C. Processing of the precursor to the major core polypeptide of adenovirus type 5 removes a region near the amino terminus. Virology 82 (1977): 513-517

Rekosh, D.M.; Russell, W.C.; Bellett, A.J.B.; Robinson, A.J. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. Cell 11 (1977): 283-295

Rich, A.; Crick, F.H.C. The molecular structure of collagen. J. Mol. Biol. 3 (1961): 483-506

Roberts, R.J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucl. Acids Res. 8 (1980): r63-r80

Robson, B.; Osguthorpe, D.J. Refined models for computer simulation of protein folding. Applications to the study of conserved secondary structure and flexible hinge points during the folding of pancreatic trypsin inhibitor. J. Mol. Biol. 132 (1979): 19-51

Roninson, I.; Padmanabhan, R. Studies of the nature of the linkage between the terminal protein and the adenovirus DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 94 (1980): 398-405

Robinson, A.J.; Bellett, A.J.D. A circular DNA-protein complex from adenoviruses and its possible role in DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 523-531

Robinson, A.J.; Younghusband, H.B.; Bellett, A.J.D. A circular DNA-protein complex from adenoviruses. Virology 56 (1973): 54-69

Rosenwirth, B.; Anderson, C.; Levine, A.J. Tryptic fingerprint analysis of adenovirus types 2, 5 and 12 DNA-binding proteins. Virology 69 (1976): 617-625

Rosenwirth, B.; Shiroki, K.; Levine, A.J.; Shimojo, H. Isolation and characterization of adenovirus type 12 DNA binding proteins. Virology 67 (1975): 14-23

Ross, S.; Levine, A.J. The genomic map position of the adenovirus type 2 glycoprotein. Virology 99 (1979): 427-430

Rowe, W.P.; Huebner, R.J.; Gillmore, L.K.; Parrott, R.H.; Ward, T.G. Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84 (1953): 570-573

Russell, G.J.; Walker, P.M.B.; Elton, R.A.; Subak-Sharpe, J.H. Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA. J. Mol. Biol. 108 (1976): 1-23

Russell, W.C.; Blair, G.E. Polypeptide phosphorylation in adenovirus-infected cells. J. Gen. Virol. 34 (1977): 19-35

Sambrook, J.; Botchan, M.; Gallimore, P.; Ozanne, B.; Pettersson, U.; Williams, J.; Sharp, P.A. Viral DNA sequences in cells transformed by simian virus 40, adenovirus type 2 and adenovirus type 5. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 615-632

Sanger, F.; Air, G.M.; Barrell, B.G.; Brown, N.L.; Coulson, A.R.; Fiddes, J.C.; HutchinsonIII, C.A.; Slocombe, P.M.; Smith, M. Nucleotide sequence of bacteriophage ØX 174 DNA. Nature 265 (1977a): 687-695

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. — DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977b):5463-5467

Schechter, N.M.; Davies, W.; Anderson, C.W. — Adenovirus coded deoxyribonucleic acid binding protein. Isolation, physical properties, and effects of proteolytic digestion. Biochemistry 19 (1980): 2802-2810

Segrest, J.P.; Jackson, R.L. — Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Meth. Enzymol. 28 (1972): 54-63

Seif, I.; Khoury, G.; Dhar, R. — BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. Nucl. Acids Res. 6 (1979): 3387-3398

Sekikawa, K.; Shiroki, K.; Shimojo, H.; Ojima, S.; Fujinaga, K. — Transformation of a rat cell line by an adenovirus 7 DNA fragment. Virology 88 (1978): 1-7

Sergeant, A.; Tigges, M.A.; Raskas, H.J. — Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA. J. Virol. 29 (1979): 888-898

Shanmugam, G.; Bhaduri, S.; Arens, M.; Green, M. — DNA binding proteins in the cytoplasm and in a nuclear membrane complex isolated from uninfected and adenovirus 2 infected cells. Biochemistry 14 (1975): 332-337

Sharp, P.A. — Speculations on RNA splicing. Cell 23 (1981): 643-646

Sharp, P.A.; Gallimore, P.H.; Flint, S.J. — Mapping of adenovirus 2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 457-474

Sharp, P.A.; Sugden, B.; Sambrook, J. — Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12 (1973): 3055-3063

Shinagawa, M.; Padmanabhan, R.
Nucleotide sequence at the inverted terminal repetition of adenovirus type 2 DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 87 (1979): 671-678

Smart, J.E.; Lewis, J.B.; Mathews, M.B.; Harter, M.L.; Anderson, C.W.
Adenovirus type 2 early proteins: Assignment of the early region 1A proteins synthesized in vivo and in vitro to specific mRNAs. Virology 112 (1981): 703-713

Smith, H.O.; Birnstiel, M.L.
A simple method for DNA restriction site mapping. Nucl. Acids Res. 3 (1976): 2387-2398

Smith, D.R.; Calvo, J.M.
Nucleotide sequence of the E.coli gene coding for dihydrofolate reductase. Nucl. Acids Res. 8 (1980): 2255-2274

Söderlund, J.; Pettersson, U.; Vennström, B.; Philipson, L.; Mathews, M.B.
A new species of virus-coded low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus type 2. Cell 7 (1976): 585-593

Southern, E.M.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 (1975): 503-517

Spector, D.J.; Crossland, L.D.; Halbert, D.N.; Raskas, H.J.
A 28k polypeptide is the translation product of 9S RNA encoded by region 1A of adenovirus 2. Virology 102 (1980a): 218-221

Spector, D.J.; Halbert, D.N .; Raskas, H.J.
Regulation of integrated adenovirus sequences during adenovirus infection of transformed cells. J. Virol. 36 (1980b): 860-871

Staden, R.
A strategy of DNA sequencing employing computer programs. Nucl. Acids Res. 6 (1979): 2601-2610

Steck, T.L.
The organization of proteins in the human red blood cell membrane. J. Cell Biol. 62 (1974): 1-19

Stillman, B.W.	Adenovirus DNA replication in vitro: a protein linked to the 5' ends of nascent DNA strands. J. Virol. 37 (1981): 139-147
Stillman, B.W.; Bellett, A.J.	An adenovirus protein associated with the ends of replicating DNA molecules. Virology 93 (1979): 69-79
Stillman, B.W.; Lewis, J.B.; Chow, L.T.; Mathews, M.B.; Smart, J.E.	Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. Cell 23 (1981): 497-508
Studier, F.W.	Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79 (1973): 237-248
Sugawara, K.; Gilead, Z.; Wold, W.S.; Green, M.	Immunofluorescence study of the adenovirus type 2 single-stranded DNA binding protein in infected and transformed cells. J. Virol. 22 (1977): 527-539
Sundquist, B.; Everitt, E.; Philipson, L.; Höglund, S.	Assembly of adenoviruses. J. Virol. 11 (1973): 449-459
Sussenbach, J.S.; Tolun, A.; Pettersson, U.	Nature of the single-stranded DNA in replicating adenovirus type 5 DNA. J. Virol. 20 (1976): 532-534
Sutcliffe, J.G.	pBR 322 restriction map derived from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucl. Acids Res. 5 (1978): 2721-2728
Sutcliffe, J.G.	Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR 322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 (1979): 77-90
Tate, V.E.; Philipson, L.	Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. Nucl. Acids Res. 6 (1979): 2769-2785

Tanford, C.	Contribution of hydrophobic interaction to the stability of the globular conformation of proteins. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962): 4240-4247
Temperli, A.; Türler, H.; Rüst, P.; Danon, A.; Chargaff, E.	Studies on the nucleotide arrangement in deoxyribonucleic acids. IX. Selective degradation of pyrimidine deoxyribonucleotides. Biochim. Biophys. Acta 91 (1964): 462-476
Thomas, G.P.; Mathews, M.B.	DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. Cell 22 (1980): 523-533
Thomas, M.; White, R.L.; Davis, R.W.	Hybridization of RNA to double-stranded DNA: Formation of R-loops. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976): 2294-2298
Tinoco, I.; Borer, P.N.; Dengler, B.; Levine, M.D.; Uhlenbeck, O.C.; Crothers, D.M.; Gralla, J.	Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature New Biol. 246 (1973): 40-41
Tooze, J. (ed.)	DNA Tumor Viruses Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd edition, Part 2 Cold Spring Harbor Laboratory 1980
Trentin, J.J.; Yabe, V.; Taylor, G.	The quest for human cancer viruses. Science 137 (1962): 835-841
Van der Eb, A.J.; Mulder, C.; Graham, F.L.; Houweling, A.	Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. Gene 2 (1977): 115-132
Van der Vliet, P.C.; Keegstra, W.; Jansz, H.S.	Complex formation between the adenovirus type 5 DNA-binding protein and single-stranded DNA. Eur. J. Biochem. 86 (1978): 389-398
Van der Vliet, P.C.; Levine, A.J.	DNA-binding proteins specific for cells infected by adenovirus. Nature New Biol. 246 (1973): 170-174

Van der Vliet, P.C.; Levine, A.J.; Ensinger, M.; Ginsberg, H.S.
Thermolabile DNA binding proteins from cells infected with a temperature-sensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis.
J. Virol. 15 (1975): 348-354

Van der Vliet, P.C.; Sussenbach, J.S.
An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication.
Virology 67 (1975): 415-426

Van der Vliet, P.C.; Zandberg, J.; Jansz, H.S.
Evidence for a function of the adenovirus DNA-binding protein in initiation of DNA synthesis as well as in elongation of nascent DNA chains.
Virology 80 (1977): 98-110

Veres-Molnar, S.; Block, J.; Büttner, W.
Sequence of the adenovirus 2 region coding for the 3'-terminus of the DNA binding protein messenger RNA.
Med. Microbiol. Immunol. 169 (1981): 117

Von Sengbusch, P.
Molekular- und Zellbiologie
p. 396
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1979

Watson, R.; Zuker, M.; Martin, S.M.; Visentin, L.P.
A new site-specific endonuclease from Neisseria cinerea.
FEBS Letters 118 (1980): 47-50

Weber, J.; Blanchard, J.M.; Ginsberg, H.; Darnell, J.E. jr.
Order of polyadenylic acid addition and splicing events in early adenovirus mRNA formation.
J. Virol. 33 (1980): 286-291

Weber, J.; Jelinek, W.; Darnell, J.E. jr.
The definition of a large viral transcription unit late in Ad2 infection of HeLa cells: Mapping of nascent RNA molecules labeled in isolated nuclei.
Cell 10 (1977): 611-616

Weingärtner, B.; Winnacker, E.L.; Tolun, A.; Pettersson, U.
Two complementary strand-specific termination sites for adenovirus DNA replication.
Cell 9 (1976): 259-268

Wilkie, N.M.; Ustacelebi, S.; Williams, J.F.
Characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5: Nucleic acid synthesis.
Virology 51 (1973): 499-503

Winnacker, E.L. — Origins and termini of adenovirus type 2 DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39 (1974): 547-550

Wold, W.S.; Green, M — Adenovirus type 2 early polypeptides immunoprecipitated by antisera to five lines of adenovirus-transformed rat cells. J. Virol. 30 (1979): 297-310

Wolfson, J.; Dressler, D. — Adenovirus DNA contains an inverted terminal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972): 3054-3057

Yano, S.; Ojima, S.; Fujinaga, K.; Shiroki, K.; Shimojo, H. — Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. Virology 82 (1977): 214-220

Zabeau, M.; Roberts, R.J.; — The role of restriction endonucleases in molecular genetics. in: Molecular Genetics, Pt. 3 Chromosome Structure (J.H. Taylor, ed.), pp. 1-64 Academic Press, New York, 1979

Ziff, E.B.; Evans, R.M. — Coincidence of the promoter and capped 5' terminus of RNA from the adenovirus 2 major late transcription unit. Cell 15 (1978): 1463-1475.

L E B E N S L A U F

Name:	Block
Vorname:	Jürgen
Geburtsdatum:	11.9.50
Geburtsort:	Hagen/Westf.
Hauptwohnsitz:	Laerholzstr. 21, 507 4630 Bochum 1
Eltern:	Marie-Luise Block, geb. Borm Wilhelm Block
1957 - 1960	Besuch der Volksschule
1960 - 1970	Besuch des Fichte-Gymnasiums, Hagen
13.6.1970	Ablegen der Reifeprüfung
Juli 1970 - Juni 1972	Apothekerpraktikant in der Apotheke zum Stift, Herdecke/Ruhr
13.6.1972	Pharmazeutische Vorprüfung
Juli 1972 - September 1973	als Vorexaminierter angestellt in der obigen Apotheke
Wintersemester 1973/74 - Sommersemester 1975	Grundstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
30.9.1975	Diplomvorprüfung
Wintersemester 1975/78- Wintersemester 1977/78	Hauptstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
22.11.1977	Mündliche Diplomhauptprüfung
Januar 1978 - Januar 1979	Anfertigung der Diplomarbeit "Aufstellung und Anwendung eines Radioimmunassays für Diosgenin-glykoside" unter der Leitung von Prof. Dr. M.H. Zenk am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum
12.2.1979	Diplomhauptprüfung
Seit April 1979:	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. W. Büttner am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Ruhr-Universität Bochum.

DER DRUCKER - Buscheystraße 138 - 4630 Bochum - Tel. (02 34) 70 41 16